

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2004 年 2 月 19 日 (19.02.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/014407 A1

(51) 国際特許分類: A61K 35/78, A61P 3/04, 3/10, 43/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/009978

(22) 国際出願日: 2003 年 8 月 6 日 (06.08.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2002-233808 2002 年 8 月 9 日 (09.08.2002) JP  
特願2003-127518 2003 年 5 月 2 日 (02.05.2003) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): タカラバイオ株式会社 (TAKARA BIO INC.) [JP/JP]; 〒520-2193 滋賀県 大津市 瀬田三丁目 4 番 1 号 Shiga (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 榎竜嗣 (ENOKI, Tatsuji) [JP/JP]; 〒610-0313 京都府 京田辺市 三山木野神 4 3 Kyoto (JP). 小川衣子 (OGAWA, Kinuko) [JP/JP]; 〒520-2134 滋賀県 大津市 瀬田三丁目 8-8-2 0 3 Shiga (JP). 大野木宏 (OHNOGI, Hiromu) [JP/JP]; 〒525-0025 滋賀県 草津市 西渋谷二丁目 1 2-1-3 1 1 Shiga (JP). 杉山勝美 (SUGIYAMA, Katsumi) [JP/JP]; 〒520-2134 滋賀県 大津市 瀬田三丁目 8-8-2 1 0 Shiga (JP). 村木信子 (MURAKI, Nobuko) [JP/JP]; 〒529-1851 滋賀県 甲賀郡 信楽町長野 5 2 0 Shiga (JP). 佐川裕章 (SAGAWA, Hiroaki) [JP/JP]; 〒525-0025 滋賀県 草

津市 西渋谷二丁目 6-3 2 Shiga (JP). 加藤 郁之進 (KATO, Ikunoshin) [JP/JP]; 〒611-0028 京都府 宇治市 南陵町 1-1-1 5 0 Kyoto (JP).

(74) 代理人: 細田 芳徳 (HOSODA, Yoshinori); 〒540-6591 大阪府 大阪市 中央区 大手前一丁目 7 番 3 1 号 OMM ビル 5 階 私書箱 2 6 号 細田国際特許事務所内 Osaka (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: REMEDY

(54) 発明の名称: 治療剤

(57) Abstract: A preventive or a remedy for diseases accompanied by disorders in insulin level or insulin response, an insulin-like agent, a food, a drink or a feed for treating or preventing diseases accompanied by disorders in insulin level or insulin response, an agent promoting the intake of glucose into cells and an agent inducing differentiation into adipocytes, each containing a processed umbellifer as the active ingredient.

(57) 要約: 本発明は、セリ科植物由来処理物を有効成分として含有する、インスリン量またはインスリン応答の変調を伴う疾患の治療剤又は予防剤、インスリン様作用剤、インスリン量またはインスリン応答の変調を伴う疾患の治療用又は予防用の食品、飲料又は飼料、細胞へのグルコース取り込み促進剤、ならびに脂肪細胞への分化誘導剤に関する。

WO 2004/014407 A1

## 明 細 書

### 治療剤

#### 技術分野

本発明は、生体内でインスリンが関連する疾病、例えば糖尿病や肥満症等の治療または予防に有用な医薬、食品、飲料又は飼料に関する。

#### 背景技術

インスリンは、哺乳動物の正常な炭水化物、タンパク質、及び脂肪代謝に必要なホルモンである。I型糖尿病のヒトは、生命を支えるホルモンであるインスリンが十分産生されないので、生存のために外部からのインスリン投与を必要とする。II型糖尿病のヒトは、インスリン産生量の不足、インスリン抵抗性などの要因による不適切な血液グルコース量の適切な量への制御のために、インスリンの投与やインスリン分泌促進薬の投与が必要となる。しかし、II型糖尿病のヒトの中でも、高インスリン血症やインスリン受容体異常、インスリン受容体の下流シグナルの異常などにより起こるインスリン抵抗性が要因の糖尿病患者については、インスリンやインスリン分泌促進薬を投与しても治療効果は見られないことがある。

近年、インスリンの副作用や上記の問題を解決するため、インスリンと同様の生理機能を有する物質（以下、インスリン様物質と称することもある）の開発が行われてきており、合成のベンゾキノン誘導体がインスリン様物質であること（例えば、国際公開第99/51225号パンフレット参照。）、またシコン（紫根）由来のシコニンがインスリン様物質であること（例えば、Kamei R.

他7名, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2002年, Vol. 292, P642-651参照。）が判明している。これ

らのようなインスリン様物質は、I型糖尿病患者だけでなく、II型糖尿病患者、さらにはインスリン抵抗性が要因のII型糖尿病患者についても、インスリンと同様の生理活性を示すことにより症状を改善することが期待されている。

アシタバはセリ科の大型多年性草本であり、さまざまな健康促進効果が知られている。例えば、アシタバの有する生理活性としては、高血圧予防効果、抗菌作用、抗腫瘍作用、胃酸分泌抑制作用、抗癌効果、神経成長因子産生増強効果、肝細胞増殖因子産生増強作用が知られている（例えば、国際公開第01/76614号パンフレット参照。）。しかし、抗糖尿病作用や抗肥満作用等の、インスリン様作用についてはこれまで知られていなかった。

セロリはセリ科に属する、さまざまな生理作用が知られている植物である。セロリの生理作用としては、抗血液凝固作用、制がん作用等が知られている。しかし、抗糖尿病作用や抗肥満作用等の、インスリン様作用についてはこれまで知られていなかった。

パセリはセリ科に属する、さまざまな生理作用が知られている植物である。パセリの生理作用としては、貧血改善、食中毒予防作用、止血作用、疲労回復、発汗、利尿、保温効果等が知られている。しかし、抗糖尿病作用や抗肥満作用等の、インスリン様作用についてはこれまで知られていなかった。

## 発明の開示

本発明の目的は、天然物由来で安全で、簡便に摂取可能な、食品素材、医薬品素材として適したインスリン様作用を有する植物由来の処理物を開発し、当該処理物を用いた、医薬、食品、飲料または飼料を提供することにある。

以下、本発明を概説すれば、本発明の第1の発明は、セリ科植物由来処理物を有効成分として含有することを特徴とするインスリン量またはインスリン応答の変調を伴う疾患の治療剤又は予防剤に関する。

本発明の第2の発明は、セリ科植物由来処理物を有効成分として含有すること

を特徴とするインスリン様作用剤に関する。

本発明の第3の発明は、セリ科植物由来処理物を有効成分として含有することを特徴とするインスリン量またはインスリン応答の変調を伴う疾患の治療用又は予防用の食品、飲料又は飼料に関する。

本発明の第4の発明は、セリ科植物由来処理物を有効成分として含有することを特徴とする細胞へのグルコース取り込み促進剤に関する。

本発明の第5の発明は、セリ科植物由来処理物を有効成分として含有することを特徴とする脂肪細胞への分化誘導剤に関する。

本発明の第1～5の発明において、セリ科植物としては、例えばアシタバ、セロリ又はパセリが例示される。

#### 図面の簡単な説明

第1図は、アシタバ根抽出画分により分化誘導された脂肪細胞のトリグリセリド生合成量を示す図である。

第2図は、アシタバ根部抽出画分分画フラクション3、4により分化誘導された脂肪細胞のトリグリセリド生合成量を示す図である。

第3図は、アシタバ根抽出画分によるグルコース取り込み促進作用を示す図である。

第4図は、アシタバ葉抽出画分により分化誘導された脂肪細胞のトリグリセリド生合成量を示す図である。

第5図は、セロリ葉抽出画分により分化誘導された脂肪細胞のトリグリセリド生合成量を示す図である。

第6図は、セロリ葉抽出画分によるグルコース取り込み促進作用を示す図である。

第7図は、パセリ抽出画分により分化誘導された脂肪細胞のトリグリセリド生合成量を示す図である。

第8図は、パセリ抽出画分によるグルコース取り込み促進作用を示す図である。

第9図は、アシタバ根抽出画分により分化誘導された脂肪細胞のトリグリセリド生合成量を示す図である。

第10図は、アシタバ根抽出画分によるグルコース取り込み促進作用を示す図である。

第11図は、アシタバ葉抽出画分によるグルコース取り込み促進作用を示す図である。

第12図は、アシタバ根抽出物分画フラクションによるグルコース取り込み促進作用を示す図である。

第13図は、アシタバ根エタノール抽出画分によるグルコース取り込み促進作用のサイトカラシンBによる阻害作用を示す図である。

第14図は、アシタバ根エタノール抽出画分とインスリンによるグルコース取り込み促進作用の相乗効果を示す図である。

第15図は、アシタバ根エタノール抽出画分により分化誘導した脂肪細胞でのインスリン刺激によるグルコース取り込み促進作用を示す図である。

第16図は、アシタバ茎葉抽出画分により分化誘導された脂肪細胞のトリグリセリド生合成量を示す図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明において、セリ科植物とは、被子植物類セリ科に属する植物であって、例えばアシタバ、セリ、ミツバ、シシウド、ニンジン、セロリ、パセリ等が例示される。本発明においては、アシタバ、セロリ、パセリが特に好適に使用できる。本発明において、これらは単独でもしくは2種以上を混合して使用することができる。また、本発明に使用されるセリ科植物は、特に限定はないが、果実、種子、種皮、花、葉、茎、根、根茎及び／又は植物全体そのままを使用することが

できる。

本発明において有効成分として使用されるセリ科植物由来処理物としては、インスリン様作用を有していれば特に限定はないが、例えば抽出物、粉碎物、搾汁液、破碎物、化学処理物、酵素処理物をいい、特に好適には抽出物、粉碎物および搾汁液が例示される。本発明の有効成分として使用されるものであれば特に限定はない。各処理物は単独でもしくは2種以上を混合して使用することができる。

。

なお、本発明においてインスリン様作用とは、インスリンと同等の生理活性を示すものであれば特に限定はなく、例えば、細胞における糖、アミノ酸の取り込み促進、グリコーゲン、タンパク質合成及び分解抑制などの代謝調節作用が例示される。本発明の有効成分としては、少なくとも脂肪細胞への分化誘導作用または細胞へのグルコース取り込み促進作用を示せばよい。かかるインスリン様作用の有無については、後述の実施例3又は5に記載の方法により簡便に測定することができる。

本発明において、抽出物とは抽出溶媒を用いて抽出操作を行う工程を経て得られる物質のことをいう。抽出は、公知の抽出方法により以下のように行うことができる。例えば原料を粉碎もしくは細断した後、溶媒を用いてバッチ式もしくは連続式で行うことができる。抽出物を得る際の抽出溶媒としては、特に限定はないが、水、クロロホルム、エタノール、メタノール、イソプロピルアルコール等のアルコール類、アセトン、メチルエチルケトン等のケトン類、酢酸メチル、酢酸エチル等の親水性もしくは親油性の溶媒を挙げることができ、所望により単独で、もしくは適宜混合液として用いることができる。抽出溶媒の量は適宜決定すればよいが、通常、原料（固形分）に対し、重量で、好ましくは0.1～100倍量の抽出溶媒を使用すれば良い。抽出温度も適宜、目的に応じて決定すればよいが、水抽出の場合は通常、好ましくは4～130℃、より好ましくは25～100℃である。また、溶媒中にエタノールが含まれる場合は4～60℃の範囲が

好適である。抽出時間も、抽出効率を考慮し決定すればよいが、通常、好ましくは数秒～数日、より好ましくは5分～24時間の範囲となるように、原料、抽出溶媒、抽出温度を設定するのが好適である。抽出操作は、たとえば、攪拌しながら又は静置して行えばよく、また、必要に応じて数回繰り返してもよい。以上の操作により、セリ科植物由来の抽出物（以下、本発明の抽出物と称することがある。）が得られる。抽出物は必要に応じ、ろ過、遠心分離、濃縮、限外ろ過、分子ふるい等の処理を行い、目的のインスリン様物質が濃縮された抽出物を調製することができる。抽出物や濃縮抽出物のインスリン様作用は、後述の実施例3又は5記載の方法により簡便に測定することができる。また、セリ科植物を公知の方法で茶葉状にし、これを用いた抽出物（例えば、アシタバ茶）もインスリン様作用を有していれば、本発明の抽出物として使用することができる。また、これらの抽出物を2種以上含有させて使用することもできる。なお、本発明においては異なった抽出法で得られた抽出物を2種以上含有させて使用することもできる。

また、本発明においては、セリ科植物由来の抽出物を公知の方法で分画することによって得られる画分や、分画操作を複数回繰り返すことにより得られる画分についても本発明の抽出物に包含される。上記の分画手段としては、抽出、分別沈殿、カラムクロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー等が挙げられる。得られた画分の精製を、インスリン様作用を指標としてさらに進めることにより、インスリン様物質を単離することもできる。

また、セリ科植物由来の抽出物以外の、セリ科植物由来処理物の製造方法としては、例えば植物を乾燥させ、粉碎することで粉状のセリ科植物由来の粉碎物を得ることができる。乾燥は、凍結乾燥により行うのが好ましい。また、凍結粉碎により粉碎物を得てもよい。

また、セリ科植物由来の搾汁液の製造方法としては、公知の植物の搾汁方法であれば特に限定はないが、例えばスクリー式、ギア式、カッター式等の搾り機

やジュースーを用いて搾汁することができる。また、前処理として細断あるいはすりつぶして、上述のジュースー又は布等で絞って搾汁液を得ることもできる。

破碎物とは、セリ科植物を碎き壊したものであり、一般には粉碎物よりも組織片が大きく、例えば、破碎機を使用することにより製造することができる。また、化学処理物とは、特に限定はないが、セリ科植物を酸処理、アルカリ処理、酸化処理、還元処理等に従して得られた物をいい、例えば、塩酸、硫酸、硝酸、クエン酸、酢酸等の無機酸や有機酸、又は水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、アンモニア等の無機塩基や有機塩基を含む水溶液にセリ科植物を浸漬することにより製造することができる。化学処理物には、前記のような化学処理を受けた植物体に由来するすべてのものを含む。酵素処理物とは、例えば、ペクチナーゼ、セルラーゼ、キシラナーゼ、アミラーゼ、マンナーゼ、グルコシダーゼ等による酵素処理物、微生物による酵素反応物（例えば、発酵物）をいい、例えば、セリ科植物に対して上記酵素を適当な緩衝液中で作用させることにより製造することができる。酵素処理物には、前記のような酵素処理を受けた植物体に由来するすべてのものを含む。さらに、セリ科植物由来処理物としては、例えば、セリ科植物の茎を切断し、その切断面から得られる汁液も包含される。

本発明において、セリ科植物由来処理物の形状としては、インスリン様作用を有していれば特に限定はないが、粉状、固形状、液状のいずれの形状であってもよい。また、当該物質を公知の方法で造粒して粒状の固形物として、本発明のセリ科植物由来処理物として使用することができる。造粒方法としては、特に限定はないが、転動造粒、攪拌造粒、流動層造粒、気流造粒、押出し造粒、圧縮成型造粒、解砕造粒、噴射造粒又は噴霧造粒等が例示される。粉状の当該セリ科植物由来処理物を液体、例えば水やアルコール等に溶解して液状とし、本発明のセリ科植物由来処理物として使用することもできる。

また、本発明においては、有効成分そのものを、例えば、本明細書に記載するインスリン量またはインスリン応答の変調を伴う疾患の治療用又は予防用の食品



、飲料、飼料等として使用することができる。有効成分そのものを使用する態様としては、例えば、前記抽出物や粉碎物等を錠剤の形にしたものを挙げるができる。錠剤の製造は、公知の打錠方法に従って行えばよい。

また、本発明はセリ科植物由来処理物を高濃度又は高純度に含有する食品、飲料又は飼料を提供するが、これは従来の食品、飲料又は飼料と比べて、本発明の食品、飲料又は飼料中にインスリン様物質が高濃度及び／又は高純度に含有されていることを意味する。かかる食品、飲料又は飼料は、例えば、後述するようにして、従来の食品等に本発明の有効成分を含有せしめることにより製造することができる。

なお、本発明において、セリ科植物由来処理物を本発明の有効成分と称し、本発明の有効成分を含有するインスリン量またはインスリン応答の変調を伴う疾患の治療剤又は予防剤を本発明の治療剤又は予防剤と称することがある。

本発明に係る有効成分には、後述するように特に毒性は認められない。また、副作用の発生の心配もない。それゆえ、安全かつ適切に疾患の治療又は予防を行うことができる。従って、当該有効成分を含んでなる本発明の治療剤、予防剤、食品、飲料または飼料は、インスリン量またはインスリン応答の変調を伴う疾患の治療または予防に有効である。

また、本発明において、インスリン量またはインスリン応答の変調を伴う疾患としては、血中のインスリンレベルの変化、インスリンもしくはインスリン受容体の活性のレベルの変化、インスリン受容体の下流シグナルの異常、及びそれらの組み合わせから選択される因子によって特徴づけられる疾患が挙げられ、例えば、糖尿病、肥満症、動脈硬化、コカイン禁断症状、鬱血性心不全、心臓血管痙攣、大脳血管痙攣、クロム親和性細胞腫、神経節神経芽腫、ハンチントン病、高脂血症、高インスリン血症が例示される。糖尿病としては、I型糖尿病、II型糖尿病のいずれもが例示される。また、II型糖尿病としては、インスリンやインスリン分泌促進薬を投与しても治療効果の見られないようなインスリン抵抗性

が要因の疾患についても包含される。

インスリンは脂肪前駆細胞の脂肪細胞への分化誘導を促進することが知られており、また成熟した脂肪細胞ではグルコースを取り込み、細胞内にトリグリセリドが蓄積されることが知られている (Rubin C. S. ら、J. Biol. Chem., Vol. 253, No. 20, P 7570~7578 (1978年))。すなわち、この方法を利用して、インスリンの代わりに被験物質を投与し、脂肪細胞への分化や細胞中のトリグリセリド生合成量を測定することで、被験物質のインスリン様作用を測定することができる。

また、インスリンはグルコース取り込み促進作用が知られており、成熟した脂肪細胞ではインスリンの作用により細胞内へのグルコースの取り込みが促進されることが知られている (Rubin C. S. ら、J. Biol. Chem., Vol. 253, No. 20, P 7579-7583 (1978年))。すなわち、この方法を利用して、インスリンの代わりに被験物質を投与し、成熟脂肪細胞内へのグルコースの取り込み量を測定することで、被験物質のインスリン様作用を測定することができる。

本発明の治療剤または予防剤としては、本発明に係る前記有効成分を公知の医薬用担体と組み合わせて製剤化したものが挙げられる。

本発明の治療剤または予防剤の製造は、通常、前記有効成分を薬学的に許容できる液状または固体状の担体と配合することにより行われ、所望により溶剤、分散剤、乳化剤、緩衝剤、安定剤、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤等を加えて、錠剤、顆粒剤、散剤、粉末剤、カプセル剤等の固形剤、通常液剤、懸濁剤、乳剤等の液剤とすることができる。また、使用前に適当な担体の添加によって液状となし得る乾燥品や、その他、外用剤とすることもできる。

医薬用担体は、治療剤または予防剤の投与形態および剤型に応じて選択することができる。固体組成物からなる経口剤とする場合は、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、細粒剤、顆粒剤等とすることができ、たとえば、デンプン、乳糖、白糖

、マンニット、カルボキシメチルセルロース、コーンスターチ、無機塩などが利用される。また経口剤の調製に当っては、更に結合剤、崩壊剤、界面活性剤、潤沢剤、流動性促進剤、矯味剤、着色剤、香料などを配合することもできる。たとえば、錠剤または丸剤とする場合は、所望によりショ糖、ゼラチン、ヒドロキシプロピルセルロースなどの糖衣または胃溶性もしくは腸溶性物質のフィルムで被覆してもよい。液体組成物からなる経口剤とする場合は、薬理学的に許容される乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤などとすることができ、たとえば、精製水、エタノールなどが担体として利用される。また、さらに所望により湿潤剤、懸濁剤のような補助剤、甘味剤、風味剤、防腐剤などを添加してもよい。

一方、非経口剤とする場合は、常法に従い本発明の前記有効成分を希釈剤としての注射用蒸留水、生理食塩水、ブドウ糖水溶液、注射用植物油、ゴマ油、落花生油、大豆油、トウモロコシ油、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなどに溶解ないし懸濁させ、必要に応じ、殺菌剤、安定剤、等張化剤、無痛化剤などを加えることにより調製することができる。また、固体組成物を製造し、使用前に無菌水または無菌の注射用溶媒に溶解して使用することもできる。

外用剤としては、経皮投与用または経粘膜（口腔内、鼻腔内）投与用の、固体、半固体状または液状の製剤が含まれる。また、座剤なども含まれる。たとえば、乳剤、ローション剤などの乳濁剤、外用チンキ剤、経粘膜投与用液剤などの液状製剤、油性軟膏、親水性軟膏などの軟膏剤、フィルム剤、テープ剤、パップ剤などの経皮投与用または経粘膜投与用の貼付剤などとすることができる。

以上の各種製剤は、それぞれ公知の医薬用担体などを利用して、適宜、常法により製造することができる。また、かかる製剤における有効成分の含有量は、その投与形態、投与方法などを考慮し、好ましくは後述の投与量範囲で当該有効成分を投与できるような量であれば特に限定されるものではない。

本発明の治療剤又は予防剤は、製剤形態に応じた適当な投与経路で投与される。投与方法も特に限定はなく、内用、外用および注射によることができる。注射

剤は、たとえば静脈内、筋肉内、皮下、皮内などに投与し得、外用剤では、たとえば、座剤をその適する投与方法により投与すればよい。

本発明の治療剤または予防剤としての投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的および当該治療剤または予防剤の投与対象である患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され一定ではない。一般には、製剤中に含有される前記有効成分の投与量で、好ましくはヒト（例えば、成人）1日当り0.1  $\mu\text{g}$  ~ 1 g / kgである。もちろん投与量は、種々の条件によって変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。投与は、所望の投与量範囲内において、1日内において単回で、または数回に分けて行ってもよい。また、本発明の治療剤または予防剤はそのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。また、本発明の有効成分は、本発明の有効成分と同等の作用を有する物質、例えばインスリンと併用することにより、実施例20に記載の通り、これらの相乗効果を期待することができる。

また、本発明は前記有効成分を含むインスリン様作用剤を提供することもできる。当該インスリン様作用剤としては、前記有効成分そのものであってもよく、また、前記有効成分を含む組成物であってもよい。当該インスリン様作用剤は、たとえば、前記有効成分を当該有効成分と同じ用途に使用可能な他の成分（例えばインスリン等）などと配合し、上記治療剤または予防剤の製造方法に準じて通常使用される試薬の形態に製造すればよい。当該インスリン様作用剤における前記有効成分の含有量は、当該インスリン様作用剤の投与方法、使用目的などを考慮し、本発明の所望の効果の発現が得られ得るような量であればよく、特に限定されるものではない。有効成分の含有量としては、例えば、0.01 ~ 100重量%である。また、当該インスリン様作用剤の使用量も、本発明の所望の効果の発現が得られ得る量であれば特に限定されるものではない。特に、生体に投与して使用する場合には、好ましくは前記治療剤または予防剤における有効成分の投

与量の範囲内で有効成分を投与できるような量で使用すればよい。インスリン様作用剤は、インスリン量またはインスリン応答の変調を伴う疾患において有用である。また、当該インスリン様作用剤は、これらの疾患に対する治療又は予防用の食品、飲料又は飼料の製造に使用することもできる。これらの食品、飲料又は飼料については、前述のインスリン量またはインスリン応答の変調を伴う疾患の治療用又は予防用の食品、飲料又は飼料に準じて使用することができる。また、当該インスリン様作用剤はインスリン量またはインスリン応答の変調を伴う疾患に対する薬物のスクリーニングにも有用である。さらに当該インスリン様作用剤は、インスリンによる細胞への作用メカニズム研究や、その細胞の物理的変化に関する機能研究にも有用である。

また、本発明のインスリン様作用剤をヒトに投与することにより、血中インスリン量の低下を期待することができる。すなわち、本発明のインスリン様作用剤を、治療又は予防にインスリン量の低下を要する疾患の治療又は予防剤として使用することもできる。当該疾患としては、特に限定はないが、高インスリン血症やアルツハイマー病等が例示される。また、インスリン受容体を介する刺激と延命効果については密接な関係があるという報告もあることから（Science, vol. 299, P 572~574 (2003年); Nature, vol. 424, P 277~284 (2003年)）、本発明のインスリン様作用剤を老化防止剤として使用することもできる。

本発明に係る有効成分には、後述するように特に毒性は認められない。また、副作用の発生の心配もない。それゆえ、安全かつ適切にインスリン様作用を発現することができる。従って、当該有効成分を含んでなる本発明の医薬、食品、飲料または飼料は、インスリン量またはインスリン応答の変調を伴う疾患の治療または予防に有効である。

また、本発明は、前記有効成分を含有、添加および／または希釈してなるインスリン量またはインスリン応答の変調を伴う疾患の治療用又は予防用の食品、飲

料又は飼料を提供する。本発明の食品、飲料または飼料は、そのインスリン様作用により、インスリン量またはインスリン応答の変調を伴う疾患の症状改善、予防に極めて有用である。さらに、本発明の食品又は飲料は、血糖値を低下させる作用を有する、血糖値低下用の食品又は飲料であり、血糖値が気になる方や体脂肪が気になる方に対して有効な機能性食品又は飲料として有用である。

なお、本明細書において、「含有」とは食品、飲料または飼料中に本発明で用される有効成分が含まれるという態様を、「添加」とは食品、飲料または飼料の原料に、本発明で用される有効成分を添加するという態様を、「希釈」とは本発明で用される有効成分に、食品、飲料または飼料の原料を添加するという態様をいうものである。

本発明の食品、飲料または飼料の製造法に特に限定はない。たとえば、配合、調理、加工などは一般の食品、飲料または飼料のものに従えばよく、それらの製造法により製造することができ、得られた食品、飲料または飼料にインスリン様作用を有する本発明に係る前記有効成分が含有されていれば良い。

本発明の食品または飲料としては特に限定はないが、たとえば、本発明に係る前記有効成分が含有されてなる、穀物加工品（小麦粉加工品、デンプン類加工品、プレミックス加工品、麺類、マカロニ類、パン類、あん類、そば類、麩、ビーフン、はるさめ、包装餅など）、油脂加工品（可塑性油脂、てんぷら油、サラダ油、マヨネーズ類、ドレッシングなど）、大豆加工品（豆腐類、味噌、納豆など）、食肉加工品（ハム、ベーコン、プレスハム、ソーセージなど）、水産製品（冷凍すりみ、かまぼこ、ちくわ、はんぺん、さつま揚げ、つみれ、すじ、魚肉ハム、ソーセージ、かつお節、魚卵加工品、水産缶詰、つくだ煮など）、乳製品（原料乳、クリーム、ヨーグルト、バター、チーズ、練乳、粉乳、アイスクリームなど）、野菜・果実加工品（ペースト類、ジャム類、漬け物類、果実飲料、野菜飲料、ミックス飲料など）、菓子類（チョコレート、ビスケット類、菓子パン類、ケーキ、餅菓子、米菓類など）、アルコール飲料（日本酒、中国酒、ワイン、

・ ウイスキー、焼酎、ウオッカ、ブランデー、ジン、ラム酒、ビール、清涼アルコール飲料、果実酒、リキュールなど）、嗜好飲料（緑茶、紅茶、ウーロン茶、コーヒー、清涼飲料、乳酸飲料など）、調味料（しょうゆ、ソース、酢、みりんなど）、缶詰・瓶詰め・袋詰め食品（牛飯、釜飯、赤飯、カレー、その他の各種調理済み食品）、半乾燥または濃縮食品（レバーペースト、その他のスプレッド、そば・うどんの汁、濃縮スープ類）、乾燥食品（即席麺類、即席カレー、インスタントコーヒー、粉末ジュース、粉末スープ、即席味噌汁、調理済み食品、調理済み飲料、調理済みスープなど）、冷凍食品（すき焼き、茶碗蒸し、うなぎかば焼き、ハンバーグステーキ、シュウマイ、餃子、各種スティック、フルーツカクテルなど）、固形食品、液体食品（スープなど）、香辛料類などの農産・林産加工品、畜産加工品、水産加工品などが挙げられる。

本発明の食品または飲料は、前記有効成分が単独もしくは複数含有、添加および／または希釈されており、その含有量がインスリン様作用を発現するための必要量に相当するものであれば特にその形状に限定はなく、タブレット状、顆粒状、カプセル状等の形状の経口的に摂取可能な形状物も包含する。

また、本発明の飲料については、本発明の有効成分と、セリ科以外の植物、例えば野菜や果実等の搾汁液と混合もしくはセリ科植物と同時に搾汁して健康飲料とすることもできる。例えば、アシタバの搾汁液を水で希釈したり、ニンジン、小松菜、カブ、チンゲンサイ、トマト、ミカン、レモン、グレープフルーツ、キウイ、ほうれん草、ラディッシュ、大根、白菜、キャベツ、サラダ菜、レタス、ニラ、オクラ、ピーマン、キュウリ、インゲン、えだまめ、エンドウ、トウモロコシ、ニンニク、ルッコラ、ビワ、夏みかん、甘夏等の搾汁液、牛乳、豆乳等と混合してインスリン様作用を有する健康飲料とすることができる。

本発明の食品又は飲料中の前記有効成分の含有量は特に限定されず、その官能と活性発現の観点から適宜選択できるが、例えば食品 100 重量% 当たり好ましくは 0.00001 重量% 以上、より好ましくは 0.0001～10 重量%、更

に好適には0.0006～6重量%であり、例えば、飲料100重量%当たり好ましくは0.00001重量%以上、より好ましくは0.0001～10重量%、更に好適には0.0006～6重量%である。また本発明の食品又は飲料は、好ましくは、それらに含有される有効成分が、例えばヒト（例えば、成人）1日当たり0.001mg～10g/kg、好ましくは0.1mg～1g/kgとなるように摂取すればよい。

また、前記するように、有効成分を錠剤の形で食品等として提供する場合、有効成分の含有量としては、例えば、0.01～100重量%である。一方、搾汁液をそのまま飲料とする場合、本発明の有効成分の含有量は、例えば、0.01～100重量%である。

また、本発明は、前記有効成分を含有、添加および／または希釈してなる、インスリン様作用を有する生物用の飼料を提供するものであり、さらに、別の一態様として、前記有効成分を生物に投与することを特徴とする生物の飼育方法をも提供する。また、本発明の飼料の別の一態様として、前記有効成分を含有することを特徴とする生物飼育用剤が提供される。

これらの発明において、生物とはたとえば養殖動物、ペット動物などであり、養殖動物としては家畜、実験動物、家禽、魚類、甲殻類または貝類が例示される。飼料としては体調の維持および／または改善用飼料が例示される。生物飼育用剤としては浸漬用剤、飼料添加剤、飲料用添加剤が例示される。

これらの発明によれば、それらを適用する前記例示するような生物において、本発明に使用される前記有効成分のインスリン様作用に基づき、本発明の前記治療剤または予防剤によるのと同様の効果の発現が期待できる。すなわち、前記飼料等は、当該生物におけるインスリン量またはインスリン応答の変調を伴う疾患の治療または予防効果を有する。

本発明に使用される前記有効成分は通常、対象生物の体重1kg、1日当たり好ましくは0.01～2000mg投与される。投与は、たとえば、当該有効成



分を、対象生物に供する人工配合飼料の原料中に添加混合しておくか、人工配合飼料の粉末原料と混合した後、その他の原料にさらに添加混合することで行うことができる。また、前記有効成分の飼料中の含有量は特に限定されるものではなく、目的に応じて適宜設定すれば良いが、0.001～15重量%の割合が好適である。

本発明の飼料の製造法に特に限定はなく、また配合も一般の飼料に準ずるものであればよく、製造された飼料中にインスリン様作用を有する本発明に係る前記有効成分が含まれていればよい。

本発明が適用できる生物としては限定はないが、養殖動物としては、ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ラクダ、ラマなどの家畜、マウス、ラット、モルモット、ウサギなどの実験動物、ニワトリ、アヒル、七面鳥、駝鳥などの家禽、ペット動物としてはイヌ、ネコなどが挙げられ、広く適用できる。

インスリン様作用を有する本発明に使用される前記有効成分を含んでなる飼料を摂取させること、またはインスリン様作用を有する本発明に使用される前記有効成分の含有液に対象生物を浸漬することにより、家畜、実験動物、家禽、ペット動物などの体調を良好に維持し、または、改善させたりすることができる。これらの例は、本発明の飼育方法に包含される。

また、本発明は前記有効成分を含む細胞へのグルコース取り込み促進剤を提供することもできる。当該グルコース取り込み促進剤としては、前記有効成分そのものであってもよく、また、前記有効成分を含む組成物であってもよい。当該グルコース取り込み促進剤は、たとえば、前記有効成分を当該有効成分と同じ用途に使用可能な他の成分（例えばインスリン等）などと配合し、上記治療剤または予防剤の製造方法に準じて通常使用される試薬の形態に製造すればよい。当該グルコース取り込み促進剤における前記有効成分の含有量は、当該グルコース取り込み促進剤の投与方法、使用目的などを考慮し、本発明の所望の効果の発現が得られ得るような量であればよく、特に限定されるものではない。有効成分の含有

量としては、例えば、0.01～100重量%である。また、該グルコース取り込み促進剤の使用量も、本発明の所望の効果の発現が得られ得る量であれば特に限定されるものではない。特に、生体に投与して使用する場合には、好ましくは前記治療剤または予防剤における有効成分の投与量の範囲内で有効成分を投与できるような量で使用すればよい。当該グルコース取り込み促進剤は、治療又は予防に細胞へのグルコース取り込み促進作用を要する疾患の治療又は予防に有用である。当該疾患としては、例えば上記のインスリン量またはインスリン応答の変調を伴う疾患のほか、心臓疾患、特に心筋梗塞、虚血後の心臓損傷等が例示される。また、当該グルコース取り込み促進剤は、細胞によるグルコースの取り込みを促進することから、筋肉細胞においては当該作用が機能することにより、筋肉増強作用、疲労回復作用を誘発することができる。また、当該グルコース取り込み促進剤は、これらの疾患に対する治療又は予防用の食品、飲料又は飼料の製造に使用することもできる。これらの食品、飲料又は飼料については、前述のインスリン量またはインスリン応答の変調を伴う疾患の治療用又は予防用の食品、飲料又は飼料に準じて使用することができる。また、当該グルコース取り込み促進剤は上記の治療又は予防に細胞へのグルコース取り込み促進作用を要する疾患に対する薬物のスクリーニングにも有用である。さらに当該グルコース取り込み促進剤は、細胞によるグルコース取り込み作用のメカニズム研究やその細胞の物理的変化等の機能研究にも有用である。

また、本発明は前記有効成分を含む脂肪細胞への分化誘導剤を提供することもできる。当該分化誘導剤が脂肪細胞に分化誘導できる前駆細胞としては、脂肪細胞に分化しうる細胞であれば特に限定はないが、例えば前駆脂肪細胞の他、繊維芽細胞や間葉系幹細胞等が挙げられる。当該分化誘導剤としては、前記有効成分そのものであってもよく、また、前記有効成分を含む組成物であってもよい。当該分化誘導剤は、たとえば、前記有効成分を当該有効成分と同じ用途に使用可能な他の成分（例えばインスリン等）などと配合し、上記治療剤または予防剤の製

造方法に準じて通常使用される試薬の形態に製造すればよい。当該分化誘導剤における前記有効成分の含有量は、当該分化誘導剤の投与方法、使用目的などを考慮し、本発明の所望の効果の発現が得られ得るような量であればよく、特に限定されるものではない。有効成分の含有量としては、例えば、0.01～100重量%である。また、当該分化誘導剤の使用量も、本発明の所望の効果の発現が得られ得る量であれば特に限定されるものではない。特に、生体に投与して使用する場合には、好ましくは前記治療剤または予防剤における有効成分の投与量の範囲内で有効成分を投与できるような量で使用すればよい。当該分化誘導剤は、治療又は予防に脂肪細胞への分化誘導作用を要する疾患の治療又は予防に有用である。当該疾患としては、例えば上記のインスリン量またはインスリン応答の変調を伴う疾患のほか、痛風、脂肪肝、胆石症、月経異常、不妊症等が例示される。また、当該分化誘導剤は、これらの疾患に対する治療又は予防用の食品、飲料又は飼料の製造に使用することもできる。これらの食品、飲料又は飼料については、前述のインスリン量またはインスリン応答の変調を伴う疾患の治療用又は予防用の食品、飲料又は飼料に準じて使用することができる。また、当該分化誘導剤は上記の治療又は予防に脂肪細胞への分化誘導作用を要する疾患に対する薬物のスクリーニングにも有用である。さらに当該分化誘導剤は、脂肪細胞への分化誘導作用のメカニズム研究やその物理的変化等の機能研究にも有用である。

本発明で使用される前記有効成分は、その作用発現にとっての有効量の投与を行っても毒性は認められない。たとえば経口投与の場合、アシタバ、セロリ又はパセリのエタノール抽出物をそれぞれ1 g/kgでマウスに単回投与しても死亡例は認められない。また、前記有効成分は、ラットへの経口投与において1 g/kgを経口単回投与しても死亡例は認められない。

## 実施例

以下、実施例を挙げて、本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらの

記載に何ら限定されるものではない。なお、実施例における％は特に記載がなければすべて容量％を意味する。

#### 実施例1 アシタバ根抽出画分の調製

(1) アシタバ (*Angelica Keiskei*) 根部を凍結乾燥後、細かく粉砕したもの10gに100mLのクロロホルムを加え、室温で30分間抽出を行った。吸引ろ過後、残渣について同じ操作を繰り返した。これらのクロロホルム抽出液を合わせて、ロータリーエバポレーターで減圧濃縮後、乾固物を2.5mLのジメチルスルホキシドに溶解してアシタバ根クロロホルム抽出画分を調製した。

(2) 実施例1-(1)のクロロホルム抽出後残渣に100mLのエタノールを加え、室温で30分間抽出を行った。吸引ろ過後、残渣について同じ操作を繰り返した。エタノール抽出液を合わせて、ロータリーエバポレーターで減圧濃縮後、乾固物を2.5mLのジメチルスルホキシドに溶解してアシタバ根エタノール抽出画分を調製した。

#### 実施例2 アシタバ根抽出画分の分画

アシタバ根部の乾燥粉末5.8kgに24リットルの酢酸エチルを加え、室温で3時間抽出を行い、吸引ろ過後、酢酸エチル抽出液と残渣に分けた。得られた酢酸エチル抽出液200mLについて、ロータリーエバポレーターで減圧濃縮後、クロロホルムに溶解し、シリカクロマトを用いて分画した。以下にその条件について示す。シリカゲルにはBW-300SP (富士シリシア化学社製: 100mL) を用いた。クロロホルム (500mL)、クロロホルム: メタノール (容量比、以下、同様) = 100:1 (300mL)、酢酸エチル (200mL) の順に溶出を行った。溶出液は画分1 (280mL)、画分2 (200mL)、画分3 (280mL)、画分4 (240mL) の順に分画、回収し、それぞれ減圧

濃縮、乾固の後、2 mLのエタノールに溶解し、シリカカラム分画フラクション1～4を得た。

### 実施例3 アシタバ根抽出画分による脂肪細胞への分化誘導

#### (1) 脂肪細胞への分化誘導

脂肪細胞への分化誘導は前述のRubin C. S. らの方法を一部改良して行った。200  $\mu$ Mアスコルビン酸を含む10%ウシ胎児血清（ギブコ社製）含有ダルベッコ改良イーグル培地（シグマ社製，D6046）（以下A-D-MEM培地）に前駆脂肪細胞株3T3-L1（ATCC CCL-92.1）を4  $\times$  10<sup>3</sup> 個/mLになるように懸濁し、12穴マイクロタイタープレートのウェルに2 mLずつ加えて5%炭酸ガス存在下、37℃で7日間培養した。なお、2、4日目に同培地により培地交換を行った。7日目に、0.25  $\mu$ Mデキサメタゾンを含むA-D-MEM培地に交換後、終濃度0.1%となるように実施例1-（1）で調製したアシタバ根クロロホルム抽出画分あるいは実施例1-（2）で調製したアシタバ根エタノール抽出画分を添加した。なお陽性対照として4  $\mu$ lの5 mg/mLインスリン（タカラバイオ社製）水溶液添加の区分を、陰性対照として水添加の区分を設定した。各成分添加後45時間の時点でA-D-MEM培地に交換し、各ウェルに4  $\mu$ lのアシタバ根クロロホルム抽出画分あるいはアシタバ根エタノール抽出画分、陽性対照として2  $\mu$ lの5 mg/mLインスリン水溶液、陰性対照として水を添加し、さらに7日間培養した。なお、2、4日目に培地を交換し、その際各ウェルに、4  $\mu$ lのアシタバ根クロロホルム抽出画分あるいはアシタバ根エタノール抽出画分、陽性対照として2  $\mu$ lの5 mg/mLインスリン水溶液、陰性対照として水を添加した。

#### (2) トリグリセリド生合成量の測定

成熟脂肪細胞への分化誘導の指標として、またインスリン様作用の評価として細胞中のトリグリセリドの生合成量を測定した。培養終了後、培地を除き、リン

酸緩衝塩溶液で2回細胞を洗浄し、1 mLのヘキサン：イソプロパノール=3：2の溶媒を添加して30分間室温に置いた後上清を回収した。この操作を再度繰り返し、得られた2 mLの上清を濃縮乾固した。沈殿を100  $\mu$  lのイソプロパノールに溶解後、溶液10  $\mu$  l中に含まれるトリグリセリドの量をトリグリセライドG-テスト（和光純薬社製、code 276-69801）を用い測定した。また、測定は全て2連で行った。

この結果、水添加区分と比較してアシタバ根クロロホルム抽出画分あるいはアシタバ根エタノール抽出画分添加区分においてインスリンを添加した区分と同様にトリグリセリド生合成の誘導が確認できた。すなわち、アシタバ根クロロホルム抽出画分およびアシタバ根エタノール抽出画分に脂肪細胞への分化誘導作用が認められた。これを第1図に示す。第1図は、横軸に各サンプルを、縦軸にトリグリセリド生合成量（ $\mu$ g/mL）を示す。

#### 実施例4 アシタバ根抽出物分画フラクションによる脂肪細胞への分化誘導

実施例2によって調製したアシタバ根抽出画分の各フラクションの脂肪細胞への分化誘導活性を実施例3記載の方法に準じて測定した。サンプルとして2.875 mg/mL シリカカラム分画フラクション3あるいは10.825 mg/mLのシリカカラム分画フラクション4をそれぞれ4  $\mu$  l添加した。なお陽性対照として4  $\mu$  lの5 mg/mLインスリン水溶液添加の区分を、陰性対照として水添加の区分を設定した。この後、実施例3記載の方法と同様に、培地およびサンプルの交換を行い、サンプル添加7日後に細胞中のトリグリセリドの量を測定した。

この結果、水添加区分と比較してシリカカラム分画フラクション3およびシリカカラム分画フラクション4添加区分においてインスリンを添加した区分と同様にトリグリセリド生合成の誘導が確認できた。すなわち、シリカカラム分画フラクション3およびシリカカラム分画フラクション4に脂肪細胞への分化誘導作用

が認められた。これを第2図に示す。第2図は、横軸に各サンプルを、縦軸にトリグリセリド生合成量 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を示す。

#### 実施例5 アシタバ根抽出画分のグルコース取り込み促進作用

##### (1) 成熟脂肪細胞の調製

成熟脂肪細胞への分化誘導は前述のRubin C. S. らの方法を一部改良し、行った。200  $\mu\text{M}$  アスコルビン酸を含む10%ウシ胎児血清（ギブコ社製）含有ダルベッコ改良イーグル培地（シグマ社製、D6046）に3T3-L1細胞（ATCC CCL-92.1）を $4 \times 10^3$  個/mLになるように懸濁し、12穴マイクロタイタープレートのウェルに2 mLずつ加えて5%炭酸ガス存在下、37℃で7日間培養した。7日目に、200  $\mu\text{M}$  アスコルビン酸、0.25  $\mu\text{M}$  デキサメタゾン及び10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  インスリン（タカラバイオ社製）、0.5 mM 3-イソブチル1-メチルキサンチン（ナカライテスク社製、19624-44）を含む10%ウシ胎児血清（ギブコ社製）含有ダルベッコ改良イーグル培地2 mLに交換した。45時間後に200  $\mu\text{M}$  アスコルビン酸及び5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  インスリンを含む10%ウシ胎児血清含有ダルベッコ改良イーグル培地2 mLに交換し、さらに2日後、4日後に同培地を交換し7日間培養することで成熟脂肪細胞を調製した。

##### (2) 成熟脂肪細胞へのグルコース取り込み促進作用の測定

グルコース取り込み促進作用の評価として、またインスリン様作用の評価として成熟脂肪細胞においてサンプル刺激時の細胞内への2-デオキシグルコース取り込み量を測定した。

培養終了後、培地を除き、0.1 w/v %牛血清アルブミン（シグマ社製、A8022）含有ダルベッコ改良イーグル培地で2回細胞を洗浄した後、各ウェルそれぞれ終濃度0.025%、0.008%のアシタバ根クロロホルム抽出画分ジメチルスルホキシド溶液あるいはアシタバ根エタノール抽出画分ジメチルスル

ホキシド溶液を含む同培地 1 mL を添加し、5 % 炭酸ガス存在下、37℃で一晩培養した。なお、陰性対照としてサンプルを添加しない区分を設定した。一晩培養後、ヘブス緩衝塩溶液 (140 mM NaCl、5 mM KCl、2.5 mM  $MgSO_4$ 、1 mM  $CaCl_2$ 、20 mM HEPES-Na (pH 7.4)) で2回細胞を洗浄し、各ウエルにそれぞれ終濃度 0.025 %、0.008 % のアシタバ根クロロホルム抽出画分ジメチルスルホキシド溶液あるいはアシタバ根エタノール抽出画分ジメチルスルホキシド溶液を含む同緩衝液 0.9 mL を添加し、37℃で75分間培養した。この際陽性対照として、45分間経過した時点でサンプルを添加していないウエルで終濃度  $1 \mu g/mL$  となるようにインスリンを添加した区分を設定した。その後、 $0.5 \mu Ci/mL$  2-デオキシ- [1, 2- $^3H$  (N)] -グルコース (パーキンエルマーライフサイエンス社製、NET549A)、1 mM 2-デオキシグルコース (ナカライテスク社製、10722-11) 含有ヘブス塩緩衝液  $100 \mu L$  を添加し、さらに37℃で10分間培養した。培養終了後、上清を除去し、4℃に冷却したリン酸塩緩衝液で3回細胞を洗浄後、1 % ノニデット P-40 含有リン酸塩緩衝液 0.5 mL を添加し細胞を溶解することで、細胞中に取り込まれた 2-デオキシ- [1, 2- $^3H$  (N)] -グルコースを溶出した。上清  $25 \mu L$  を用いて Aquasol 1-2 (パーキンエルマーライフサイエンス社製、6NE9529) をシンチレーションカクテルとして液体シンチレーションカウンター LS6500 (ベクマン社製) により放射活性を測定した。

この結果、各濃度のアシタバ根クロロホルム抽出画分およびアシタバ根エタノール抽出画分を添加した区分で陰性対照と比較してインスリンを添加した区分と同様に 2-デオキシ [1, 2- $^3H$  (N)] -グルコース取り込みの促進が見られた。すなわち、アシタバ根クロロホルム抽出画分およびアシタバ根エタノール抽出画分にグルコース取り込み促進活性が認められた。これを第3図に示す。第3図は、横軸に各サンプルを、縦軸に 2-デオキシ [1, 2- $^3H$  (N)] -グ



ルコース量 (d p m) を示す。

#### 実施例 6 アシタバ葉抽出画分の調製

アシタバ葉の乾燥粉末 2 g ずつに 40 mL の蒸留水、エタノール又は酢酸エチルを加え、30 分間抽出を行い、遠心分離にて抽出液と残渣に分けた。次いで残渣に対して各溶媒 30 mL による抽出操作を 2 回繰り返した。なお、水抽出は 60℃、エタノール抽出、酢酸エチル抽出は室温で行った。得られた抽出液を集めてロータリーエバポレーターで濃縮した。最終的に、水抽出液については 10 mL の蒸留水に溶解し、アシタバ葉水抽出画分を得た。エタノール抽出液については 8 mL のジメチルスルホキシドに溶解し、アシタバ葉エタノール抽出画分を得た。酢酸エチル抽出液については 5 mL のジメチルスルホキシドに溶解し、アシタバ葉酢酸エチル抽出画分を得た。

#### 実施例 7 アシタバ葉抽出画分による脂肪細胞への分化誘導

実施例 6 によって調製したアシタバ葉水抽出画分およびアシタバ葉エタノール抽出画分の成熟脂肪細胞への分化誘導作用（インスリン様活性）を実施例 3 の方法に準じて測定した。

すなわち、サンプルとして、各ウエルにそれぞれ終濃度 0.4%、0.2%、0.1% のアシタバ葉水抽出画分水溶液、あるいは各ウエルにそれぞれ終濃度 0.066%、0.022% のアシタバ葉エタノール抽出画分ジメチルスルホキシド溶液を添加した区分を設定した。なお陽性対照として 4  $\mu$ l の 5 mg/mL インスリン（タカラバイオ社製）水溶液添加の区分を、陰性対照としてジメチルスルホキシド添加の区分を設定した。この後実施例 3 記載の方法と同様に、培地およびサンプルの交換を行い、サンプル添加 7 日後に細胞中のトリグリセリドの量を測定した。

この結果、各濃度のアシタバ葉水抽出画分およびアシタバ葉エタノール抽出画

分添加区分においてトリグリセリド生合成の誘導が認められた。すなわち、アシタバ葉水抽出画分およびアシタバ葉エタノール抽出画分に成熟脂肪細胞への分化誘導作用が認められた。これを第4図に示す。第4図は、横軸に各サンプルを、縦軸にトリグリセリド生合成量 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を示す。

#### 実施例8 セロリ葉抽出画分の調製

セロリ葉の乾燥粉末2gずつに40mLの蒸留水、エタノール又は酢酸エチルを加え、30分間抽出を行い、遠心分離にて抽出液と残渣に分けた。次いで残渣に対して各溶媒30mLによる抽出操作を2回繰り返した。なお、水抽出は60℃、エタノール抽出、酢酸エチル抽出は室温で行った。得られた抽出液を集めてロータリーエバポレーターで濃縮した。最終的に、水抽出液については10mLの蒸留水に溶解し、セロリ葉水抽出画分を得た。エタノール抽出液については5mLのジメチルスルホキシドに溶解し、セロリ葉エタノール抽出画分を得た。酢酸エチル抽出液については5mLのジメチルスルホキシドに溶解し、セロリ葉酢酸エチル抽出画分を得た。

#### 実施例9 セロリ葉抽出画分による脂肪細胞への分化誘導

実施例8によって調製したセロリ葉水抽出画分、セロリ葉エタノール抽出画分およびセロリ葉酢酸エチル抽出画分の成熟脂肪細胞への分化誘導作用（インスリン様活性）を実施例3の方法に準じて測定した。

すなわち、サンプルとして、各ウエルにそれぞれ終濃度0.1%のセロリ葉水抽出画分水溶液、各ウエルにそれぞれ終濃度0.2%、0.066%、0.022%のセロリ葉エタノール抽出画分ジメチルスルホキシド溶液あるいはセロリ葉酢酸エチル抽出画分ジメチルスルホキシド溶液を添加した区分を設定した。なお陽性対照として4 $\mu\text{L}$ の5mg/mLインスリン（タカラバイオ社製）水溶液添加の区分を、陰性対照としてジメチルスルホキシド添加の区分を設定した。この

後、実施例 3 記載の方法と同様に、培地およびサンプルの交換を行い、サンプル添加 7 日後に細胞中のトリグリセリドの量を測定した。

この結果、各濃度のセロリ葉水抽出画分、セロリ葉エタノール抽出画分およびセロリ葉酢酸エチル抽出画分添加区分においてトリグリセリド生合成の誘導が認められた。すなわち、セロリ葉水抽出画分、セロリ葉エタノール抽出画分およびセロリ葉酢酸エチル抽出画分に成熟脂肪細胞への分化誘導作用が認められた。これを第 5 図に示す。第 5 図は、横軸に各サンプルを、縦軸にトリグリセリド生合成量 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を示す。

#### 実施例 10 セロリ葉抽出画分によるグルコース取り込み促進作用

実施例 8 によって調製したセロリ葉エタノール抽出画分およびセロリ葉酢酸エチル抽出画分のグルコース取り込み促進作用の評価として、またインスリン様作用の評価として、実施例 5 記載の方法に準じて成熟脂肪細胞でのサンプル刺激時の細胞内への 2-デオキシグルコース取り込み量を測定した。

すなわち、サンプルとして各ウエルにそれぞれ終濃度 0.2%、0.066% のセロリ葉エタノール抽出画分ジメチルスルホキシド溶液あるいはセロリ葉酢酸エチル抽出画分ジメチルスルホキシド溶液を添加した。なお、陰性対照としてサンプルを添加しない区分を、陽性対照として、終濃度  $1\mu\text{g}/\text{mL}$  となるようにインスリンを添加した区分を設定した。この後同様に、細胞中に取り込まれた 2-デオキシ-[1, 2- $^3\text{H}$ (N)]-グルコース量を測定した。

この結果、各濃度のセロリ葉エタノール抽出画分およびセロリ葉酢酸エチル抽出画分を添加した区分で陰性対照と比較してインスリンを添加した区分と同様に 2-デオキシ-[1, 2- $^3\text{H}$ (N)]-グルコース取り込みの促進が見られた。すなわち、セロリ葉エタノール抽出画分およびセロリ葉酢酸エチル抽出画分にグルコース取り込み促進活性が認められた。これを第 6 図に示す。第 6 図は、横軸に各サンプルを、縦軸に 2-デオキシ-[1, 2- $^3\text{H}$ (N)]-グルコース量 (

d p m) を示す。

#### 実施例 1 1 パセリ抽出画分の調製

パセリの乾燥粉末 2 g ずつに 40 mL の蒸留水、エタノール又は酢酸エチルを加え、30 分間抽出を行い、遠心分離にて抽出液と残渣に分けた。次いで残渣に対して各溶媒 30 mL による抽出操作を 2 回繰り返した。なお、水抽出は 60℃、エタノール抽出、酢酸エチル抽出は室温で行った。得られた抽出液を集めてロータリーエバポレーターで濃縮した。最終的に、水抽出液については 10 mL の蒸留水に溶解し、パセリ水抽出画分を得た。エタノール抽出液については 5 mL のジメチルスルホキシドに溶解し、パセリエタノール抽出画分を得た。酢酸エチル抽出液については 5 mL のジメチルスルホキシドに溶解し、パセリ酢酸エチル抽出画分を得た。

#### 実施例 1 2 パセリ抽出画分による脂肪細胞への分化誘導

実施例 1 1 によって調製したパセリ水抽出画分の成熟脂肪細胞への分化誘導作用（インスリン様活性）を実施例 3 の方法に準じて測定した。

すなわち、サンプルとして、各ウェルにそれぞれ終濃度 0.4%、0.2%、0.1% のパセリ水抽出画分水溶液を添加した区分を設定した。なお陽性対照として 4  $\mu$  l の 5 mg/mL インスリン（タカラバイオ社製）水溶液添加の区分を、陰性対照としてジメチルスルホキシド添加の区分を設定した。この後実施例 3 記載の方法と同様に、培地およびサンプルの交換を行い、サンプル添加 7 日後に細胞中のトリグリセリドの量を測定した。

この結果、各濃度のパセリ水抽出画分添加区分においてトリグリセリド生合成の誘導が認められた。すなわち、パセリ水抽出画分に成熟脂肪細胞への分化誘導作用が認められた。これを第 7 図に示す。第 7 図は、横軸に各サンプルを、縦軸にトリグリセリド生合成量 ( $\mu$ g/mL) を示す。

### 実施例 1 3 パセリ抽出画分によるグルコース取り込み促進作用

実施例 1 1 によって調製したパセリエタノール抽出画分およびパセリ酢酸エチル抽出画分のグルコース取り込み促進作用の評価として、またインスリン様作用の評価として、実施例 5 記載の方法に準じて成熟脂肪細胞でのサンプル刺激時の細胞内への 2-デオキシグルコース取り込み量を測定した。

すなわち、サンプルとして各ウェルにそれぞれ終濃度 0.2%、0.066% のパセリエタノール抽出画分ジメチルスルホキシド溶液あるいはパセリ酢酸エチル抽出画分ジメチルスルホキシド溶液を用いた。なお、陰性対照としてサンプルを添加しない区分を、陽性対照として、終濃度  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  となるようにインスリンを添加した区分を設定した。この後同様に、細胞中に取り込まれた 2-デオキシ- $[1, 2-^3\text{H}(\text{N})]$ -グルコース量を測定した。

この結果、各濃度のパセリエタノール抽出画分およびパセリ酢酸エチル抽出画分を添加した区分で陰性対照と比較してインスリンを添加した区分と同様に 2-デオキシ- $[1, 2-^3\text{H}(\text{N})]$ -グルコース取り込みの促進が見られた。すなわち、パセリエタノール抽出画分およびパセリ酢酸エチル抽出画分にグルコース取り込み促進活性が認められた。これを第 8 図に示す。第 8 図は、横軸に各サンプルを、縦軸に 2-デオキシ- $[1, 2-^3\text{H}(\text{N})]$ -グルコース量 (dpm) を示す。

### 実施例 1 4 アシタバ根エタノール抽出画分及び酢酸エチル抽出画分の調製

アシタバ根の乾燥粉末 2 g ずつに 40 mL のエタノール又は酢酸エチルを加え、30 分間、室温で抽出を行い、遠心分離にて抽出液と残渣に分けた。次いで残渣に対して各溶媒 30 mL による抽出操作を 2 回繰り返した。得られた抽出液を集めてロータリーエバポレーターで濃縮した。最終的に、エタノール抽出液については 1 mL のジメチルスルホキシドに溶解し、アシタバ根エタノール抽出画分

を得た。酢酸エチル抽出液については1 mLのジメチルスルホキシドに溶解し、アシタバ根酢酸エチル抽出画分を得た。

#### 実施例 15 アシタバ根エタノール抽出画分及び酢酸エチル抽出画分による脂肪細胞への分化誘導

実施例 14によって調製したアシタバ根エタノール抽出画分およびアシタバ根酢酸エチル抽出画分の成熟脂肪細胞への分化誘導作用（インスリン様活性）を実施例 3の方法に準じて測定した。

すなわち、サンプルとして、各ウエルにそれぞれ終濃度0.05、0.025%のアシタバ根エタノール抽出画分ジメチルスルホキシド溶液あるいはアシタバ根酢酸エチル抽出画分ジメチルスルホキシド溶液を添加した区分を設定した。なお陽性対照として4  $\mu$ lの5 mg/mLインスリン（タカラバイオ社製）水溶液添加の区分を、陰性対照としてジメチルスルホキシド添加の区分を設定した。この後、実施例 3記載の方法と同様に、培地およびサンプルの交換を行い、サンプル添加7日後に細胞中のトリグリセリドの量を測定した。

この結果、各濃度のアシタバ根エタノール抽出画分およびアシタバ根酢酸エチル抽出画分添加区分においてトリグリセリド生合成の誘導が認められた。すなわち、アシタバ根エタノール抽出画分およびアシタバ根酢酸エチル抽出画分に成熟脂肪細胞への分化誘導作用が認められた。これを第9図に示す。第9図は、横軸に各サンプルを、縦軸にトリグリセリド生合成量（ $\mu$ g/mL）を示す。

#### 実施例 16 アシタバ根エタノール抽出画分及び酢酸エチル抽出画分によるグルコース取り込み促進作用

実施例 14によって調製したアシタバ根エタノール抽出画分およびアシタバ根酢酸エチル抽出画分のグルコース取り込み促進作用の評価として、またインスリン様作用の評価として、実施例 5記載の方法に準じて成熟脂肪細胞でのサンプル

刺激時の細胞内への2-デオキシグルコース取り込み量を測定した。

すなわち、サンプルとして各ウェルにそれぞれ終濃度0.1%、0.05%のアシタバ根エタノール抽出画分ジメチルスルホキシド溶液あるいはアシタバ根酢酸エチル抽出画分ジメチルスルホキシド溶液を添加した。なお、陰性対照としてサンプルを添加しない区分を、陽性対照として、終濃度1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  となるようにインスリンを添加した区分を設定した。この後同様に、細胞中に取り込まれた2-デオキシ-[1, 2- $^3\text{H}$  (N)]-グルコース量を測定した。

この結果、各濃度のアシタバ根エタノール抽出画分およびアシタバ根酢酸エチル抽出画分を添加した区分で陰性対照と比較してインスリンを添加した区分と同様に2-デオキシ-[1, 2- $^3\text{H}$  (N)]-グルコース取り込みの促進が見られた。すなわち、アシタバ根エタノール抽出画分およびアシタバ根酢酸エチル抽出画分にグルコース取り込み促進活性が認められた。これを第10図に示す。第10図は、横軸に各サンプルを、縦軸に2-デオキシ-[1, 2- $^3\text{H}$  (N)]-グルコース量 (dpm) を示す。

#### 実施例17 アシタバ葉抽出画分によるグルコース取り込み促進作用

実施例6によって調製したアシタバ葉エタノール抽出画分およびアシタバ葉酢酸エチル抽出画分のグルコース取り込み促進作用の評価として、またインスリン様作用の評価として、実施例5記載の方法に準じて成熟脂肪細胞でのサンプル刺激時の細胞内への2-デオキシグルコース取り込み量を測定した。

すなわち、サンプルとして各ウェルにそれぞれ終濃度0.2%、0.1%のアシタバ葉エタノール抽出画分ジメチルスルホキシド溶液あるいはアシタバ葉酢酸エチル抽出画分ジメチルスルホキシド溶液を添加した。なお、陰性対照としてサンプルを添加しない区分を、陽性対照として、終濃度1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  となるようにインスリンを添加した区分を設定した。この後同様に、細胞中に取り込まれた2-デオキシ-[1, 2- $^3\text{H}$  (N)]-グルコース量を測定した。

この結果、各濃度のアシタバ葉エタノール抽出画分およびアシタバ葉酢酸エチル抽出画分を添加した区分で陰性対照と比較してインスリンを添加した区分と同様に2-デオキシ[1, 2-<sup>3</sup>H(N)]-グルコース取り込みの促進が見られた。すなわち、アシタバ葉エタノール抽出画分およびアシタバ葉酢酸エチル抽出画分にグルコース取り込み促進活性が認められた。これを第11図に示す。第11図は、横軸に各サンプルを、縦軸に2-デオキシ[1, 2-<sup>3</sup>H(N)]-グルコース量(dpm)を示す。

#### 実施例18 アシタバ根抽出物分画フラクションによるグルコース取り込み促進作用

実施例2によって調製したアシタバ根抽出画分の各フラクションのグルコース取り込み促進作用の評価として、またインスリン様作用の評価として、実施例5記載の方法に準じて成熟脂肪細胞でのサンプル刺激時の細胞内への2-デオキシグルコース取り込み量を測定した。

すなわち、サンプルとして終濃度0.03mg/mLのシリカカラム分画フラクション1、終濃度0.013mg/mLのシリカカラム分画フラクション2、終濃度0.0077mg/mLのシリカカラム分画フラクション3あるいは終濃度0.0096mg/mLのシリカカラム分画フラクション4を用いた。なお、陰性対照としてサンプルを添加しない区分を、陽性対照として、終濃度1μg/mLとなるようにインスリンを添加した区分を設定した。この後同様に、細胞中に取り込まれた2-デオキシ[1, 2-<sup>3</sup>H(N)]-グルコース量を測定した。

この結果、アシタバ根抽出画分の各フラクションを添加した区分で陰性対照と比較してインスリンを添加した区分と同様に2-デオキシ[1, 2-<sup>3</sup>H(N)]-グルコース取り込みの促進が見られた。すなわち、アシタバ根抽出画分のシリカカラム分画フラクション1、2、3、4のいずれにもグルコース取り込み促



進活性が認められた。これを第 1 2 図に示す。第 1 2 図は、横軸に各サンプルを、縦軸に 2-デオキシ [1, 2-<sup>3</sup>H (N)]-グルコース量 (d p m) を示す。

#### 実施例 1 9 アシタバ根エタノール抽出画分によるグルコース取り込み促進作用のサイトカラシン B による阻害

実施例 1 6 により示したアシタバ根エタノール抽出画分のグルコース取り込み促進作用が、グルコーストランスポーターの阻害剤であるサイトカラシン B により阻害されるか、実施例 5 記載の方法に準じて成熟脂肪細胞でのサンプル刺激時の細胞内への 2-デオキシグルコース取り込みにおけるサイトカラシン B の影響を試験した。

すなわち、サンプルとして終濃度 0. 1 % となるようにアシタバ根エタノール抽出画分ジメチルスルホキシド溶液を添加した区分を設定した。なお、陰性対照としてサンプルを添加しない区分を、陽性対照として、終濃度 1  $\mu$ g/mL となるようにインスリンを添加した区分を設定した。さらに各区分においてインスリンを添加した区分を設定した時期と同じ時期に終濃度 4 0  $\mu$ M となるようにサイトカラシン B (ナカライテスク社製、1 0 4 3 5 - 8 1) を添加する区分を設定した。この後同様に、細胞中に取り込まれた 2-デオキシ [1, 2-<sup>3</sup>H (N)]-グルコース量を測定した。

この結果、アシタバ根エタノール抽出画分を添加した区分で陰性対照と比較してインスリンを添加した区分と同様に 2-デオキシ [1, 2-<sup>3</sup>H (N)]-グルコース取り込みの促進が見られたが、各区分ともにサイトカラシン B 添加により 2-デオキシ [1, 2-<sup>3</sup>H (N)]-グルコース取り込みはほぼ完全に抑制された。すなわち、アシタバ根エタノール抽出画分によるグルコース取り込み促進活性は、インスリンと同様にグルコーストランスポーターを介していることが確認できた。これを第 1 3 図に示す。第 1 3 図は、横軸に各サンプルを、縦

軸に 2-デオキシ- [1, 2-<sup>3</sup> H (N)] -グルコース量 (d p m) を示す。

## 実施例 20 アシタバ根エタノール抽出画分とインスリンによるグルコース取り込み促進相乗作用

実施例 14 により調製したアシタバ根エタノール抽出画分と低濃度インスリンとのグルコース取り込み促進相乗作用の評価として、実施例 5 記載の方法に一部準じて成熟脂肪細胞でのサンプル刺激時の細胞内への 2-デオキシグルコース取り込み量を測定した。

成熟脂肪細胞の調製は実施例 5 - (1) 記載の方法に準じて行った。

培養終了後、培地を除き、0.1% (w/v) 牛血清アルブミン (シグマ社製、A8022) 含有ダルベッコ改良イーグル培地で 2 回細胞を洗浄した後、終濃度 0.02% のアシタバ根エタノール抽出画分ジメチルスルホキシド溶液を含む同培地 1 mL を添加し、5% 炭酸ガス存在下、37℃で一晩培養した。なお、陰性対照としてアシタバ根エタノール抽出画分を含まない区分を設定した。一晩培養後、ヘPes緩衝塩溶液 (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2.5 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 20 mM HEPES-Na (pH 7.4)) で 2 回細胞を洗浄し終濃度 0.02% のアシタバ根エタノール抽出画分を含む同緩衝液 0.9 mL を添加し、37℃で 45 分間培養した。続いて終濃度 0.001 μg/mL となるようにインスリンを添加しさらに 30 分間培養した。この際、対照として、アシタバ根エタノール抽出画分を添加していないウエルで終濃度 0.001 μg/mL となるようにインスリンを添加した区分を設定した。また、サンプルを添加していない区分を陰性対照とした。その後、実施例 5 - (2) 記載の方法と同様に、細胞中に取り込まれた 2-デオキシ- [1, 2-<sup>3</sup> H (N)] -グルコース量を測定した。

この結果、アシタバ根エタノール抽出画分を添加した区分で陰性対照と比較してインスリンを添加した区分と同様に 2-デオキシ- [1, 2-<sup>3</sup> H (N)] -

グルコース取り込みの促進が見られたが、インスリンと同時に添加した区分において、インスリン単独で添加した区分およびアシタバ根エタノール抽出画分単独で添加した区分のいずれよりも、グルコース取り込みの促進が認められた。すなわち、アシタバ根エタノール抽出画分には、インスリンと同時に添加することにより、グルコース取り込み促進活性を相乗的に増加させる作用があることが認められた。これを第14図に示す。第14図は、横軸に各サンプルを、縦軸に2-デオキシ-[1, 2-<sup>3</sup>H(N)]-グルコース量(dpm)を示す。

#### 実施例21 アシタバ根抽出画分により分化誘導した脂肪細胞でのインスリン刺激グルコース取り込み促進

実施例14によって調製したアシタバ根エタノール抽出画分によって分化誘導した脂肪細胞を得たのち、インスリンの刺激によって該細胞のグルコース取り込みが促進するか確認した。

すなわち、サンプルとして、終濃度0.05%のアシタバ根エタノール抽出画分ジメチルスルホキシド溶液を添加した区分を設定した。なお陽性対照として4 $\mu$ lの5mg/mLインスリン(タカラバイオ社製)水溶液添加の区分を設定した。この後、デキサメタゾン添加時期と同時期に終濃度0.5mM 3-イソブチル-1-メチルキサンチンを添加した以外は、実施例3記載の方法に準じて、培地およびサンプルの交換を行い、アシタバ根エタノール抽出画分あるいはインスリンにより分化誘導した成熟脂肪細胞を得た。

次に、実施例5記載の方法に準じて、得られた成熟脂肪細胞でのインスリン刺激時の細胞内への2-デオキシグルコース取り込み量を測定した。

すなわち、それぞれの成熟脂肪細胞において、インスリン無添加区分あるいは終濃度1 $\mu$ g/mLとなるようにインスリンを添加した区分を設定した。この後同様に、細胞中に取り込まれた2-デオキシ-[1, 2-<sup>3</sup>H(N)]-グルコース量を測定した。

この結果、アシタバ根エタノール抽出画分により分化誘導した成熟脂肪細胞において、インスリンにより分化誘導した成熟脂肪細胞と同様に、インスリンの刺激により、2-デオキシ[1, 2-<sup>3</sup>H(N)]-グルコース取り込みの促進が見られた。すなわち、アシタバ根エタノール抽出画分により分化誘導した成熟脂肪細胞には、インスリン刺激グルコース取り込み促進が認められた。これを第15図に示す。第15図は、横軸に各サンプルを、縦軸に2-デオキシ[1, 2-<sup>3</sup>H(N)]-グルコース量(dpm)を示す。

#### 実施例22 アシタバ茎葉抽出画分の調製

アシタバ茎葉の乾燥粉末2gに40mLのエタノールを加え、30分間室温で抽出を行い、遠心分離にて抽出液と残渣に分けた。次いで残渣に対して同溶媒30mLによる抽出操作を2回繰り返した。得られた抽出液を集めてロータリーエバポレーターで濃縮した。最終的に1mLのジメチルスルホキシドに溶解し、アシタバ茎葉エタノール抽出画分を得た。

#### 実施例23 アシタバ茎葉抽出画分による脂肪細胞への分化誘導

実施例22によって調製したアシタバ茎葉エタノール抽出画分の成熟脂肪細胞への分化誘導作用(インスリン様活性)を実施例3の方法に準じて測定した。

すなわち、サンプルとして、各ウエルそれぞれ終濃度0.2、0.066、0.022%のアシタバ茎葉エタノール抽出画分ジメチルスルホキシド溶液を添加した区分を設定した。なお陽性対照として4μLの5mg/mLインスリン(タカラバイオ社製)水溶液添加の区分を、陰性対照としてジメチルスルホキシド添加の区分を設定した。この後、実施例3記載の方法と同様に、培地およびサンプルの交換を行い、サンプル添加7日後に細胞中のトリグリセリドの生合成量を測定した。

この結果、各濃度のアシタバ茎葉エタノール抽出画分添加区分においてトリグ

リセリド生合成の誘導が認められた。すなわち、アシタバ茎葉エタノール抽出画分に成熟脂肪細胞への分化誘導作用が認められた。これを第16図に示す。第16図は、横軸に各サンプルを、縦軸にトリグリセリド生合成量 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を示す。

#### 実施例24 アシタバ根部エタノール抽出画分の調製

アシタバ根部の乾燥粉末200gに1リットルのエタノールを加え、室温で30分間抽出を行い、吸引ろ過後、エタノール抽出液と残渣に分けた。次いで残渣に対して同溶媒1リットルによる抽出操作を1回繰り返した。得られたエタノール抽出液を集めてロータリーエバポレーターで濃縮した。得られた濃縮物を100mLのオリーブオイルに溶解し、アシタバ根部エタノール抽出画分を調製した。

#### 実施例25 アシタバ黄色汁液由来試料の調製

アシタバ茎部を切断し、切断面から黄色の汁液を採取した。得られた汁液をろ過した後、凍結乾燥させて、乾燥粉末2gを得た。それにオリーブオイルを加え10mLとし、アシタバ黄色汁液由来試料を調製した。

#### 実施例26 アシタバ由来処理物の糖尿病改善効果

II型糖尿病モデルマウスを用いて実施例24で得られたアシタバ根部エタノール抽出画分、および実施例25で得られたアシタバ黄色汁液由来試料の病態改善効果を検討した。雌11週齢のKK-A<sub>y</sub>マウス（日本クレア社製）を、各群5匹に分け実験を行った。オリーブ油に懸濁・溶解した各種サンプルを5mL/kgで1日1回連日強制経口投与した。対照群には同様にオリーブ油を5mL/kgで投与した。投与開始前日と7日目にマウス尾静脈より採血し、簡易血糖測定システムアキュチェックコンパクト（ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社

製)にて血糖値を測定した。アシタバ根部エタノール抽出画分およびアシタバ黄色汁液由来試料の投与により、血糖値の顕著な低下が認められた。尚、実験期間中、体重および一般症状に変化は認められなかった。

#### 産業上の利用可能性

本発明により、セリ科植物由来処理物を有効成分として含有するインスリン量またはインスリン応答の変調を伴う疾患の治療用又は予防用の医薬、食品、飲料又は飼料が提供される。該医薬は糖尿病または肥満症等のインスリン量またはインスリン応答の変調を伴う疾患の治療剤又は予防剤として有用である。また、該食品又は飲料は、日常の飲食品として摂取することにより、インスリン量またはインスリン応答の変調を伴う疾患の症状改善等が可能となる。従って、セリ科植物由来処理物を含有する機能性飲食品はそのインスリン様作用により、生体の恒常性の維持に有用な機能性飲食品である。また、本発明により、セリ科植物由来処理物を含有するインスリン様作用剤も提供され、該インスリン様作用剤はインスリンの機能研究、インスリンに関連する疾患用医薬のスクリーニングに有用である。また、本発明により、セリ科植物由来処理物を含有する細胞へのグルコース取り込み促進剤も提供され、該グルコース取り込み促進剤は、治療又は予防に細胞へのグルコース取り込み促進作用を要する疾患の治療又は予防、当該疾患の治療又は予防用の食品、飲料又は飼料の製造、該グルコース取り込み促進作用を要する疾患に対する薬物のスクリーニングにも有用である。また、本発明により、セリ科植物由来処理物を含有する脂肪細胞への分化誘導剤も提供され、該分化誘導剤は、治療又は予防に脂肪細胞への分化誘導作用を要する疾患の治療又は予防、当該疾患の治療又は予防用の食品、飲料又は飼料の製造、該分化誘導作用を要する疾患に対する薬物のスクリーニングにも有用である。

### 請求の範囲

1. セリ科植物由来処理物を有効成分として含有することを特徴とするインスリン量またはインスリン応答の変調を伴う疾患の治療剤又は予防剤。
2. セリ科植物がアシタバ、セロリ又はパセリである請求項1記載の治療剤又は予防剤。
3. セリ科植物由来処理物を有効成分として含有することを特徴とするインスリン様作用剤。
4. セリ科植物がアシタバ、セロリ又はパセリである請求項3記載のインスリン様作用剤。
5. セリ科植物由来処理物を有効成分として含有することを特徴とするインスリン量またはインスリン応答の変調を伴う疾患の治療用又は予防用の食品、飲料又は飼料。
6. セリ科植物がアシタバ、セロリ又はパセリである請求項5記載の食品、飲料又は飼料。
7. セリ科植物由来処理物を有効成分として含有することを特徴とする細胞へのグルコース取り込み促進剤。
8. セリ科植物がアシタバ、セロリ又はパセリである請求項7記載のグルコース取り込み促進剤。

9. セリ科植物由来処理物を有効成分として含有することを特徴とする脂肪細胞への分化誘導剤。

10. セリ科植物がアシタバ、セロリ又はパセリである請求項9記載の分化誘導剤。



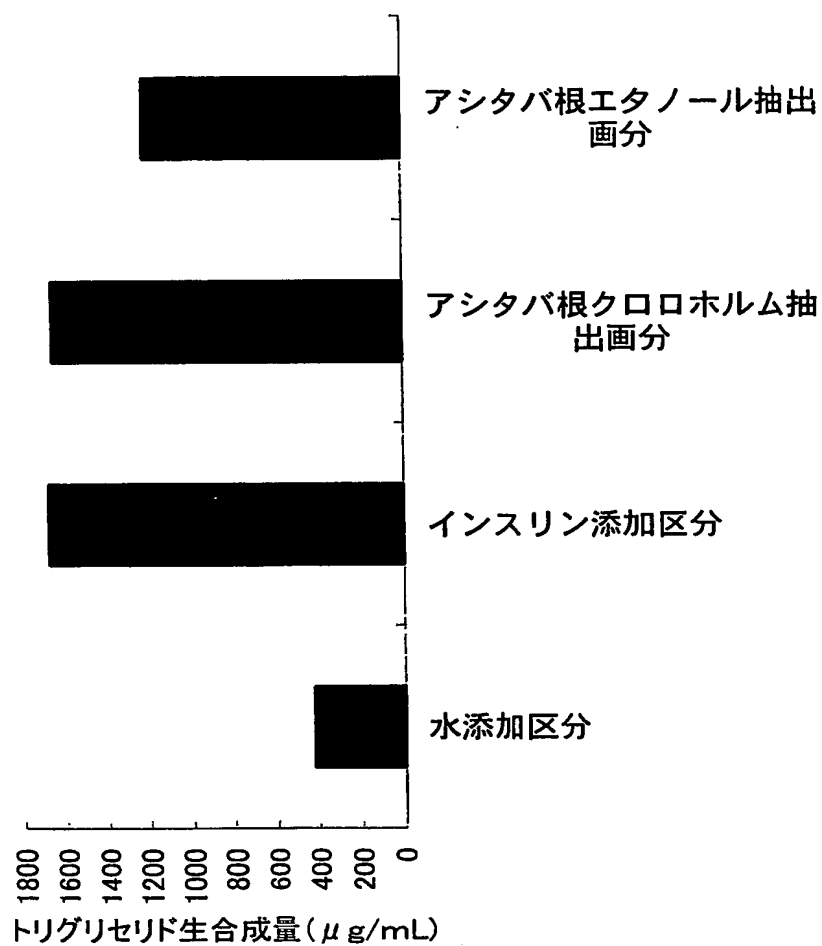
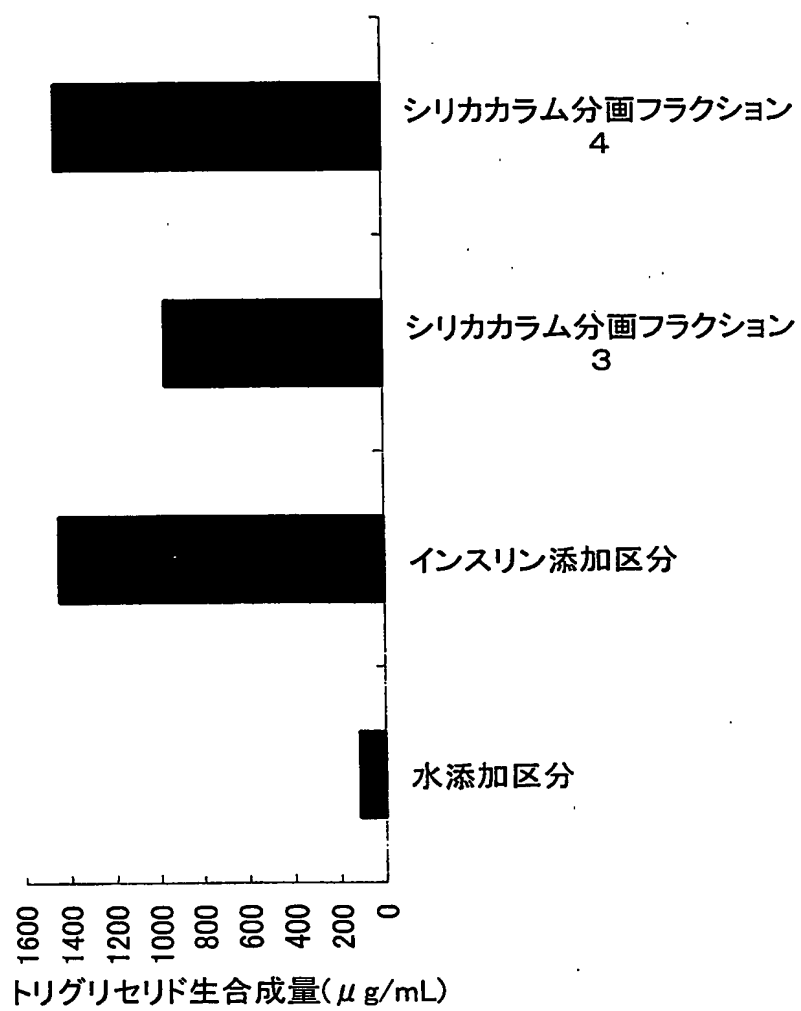


図1第1



第2図

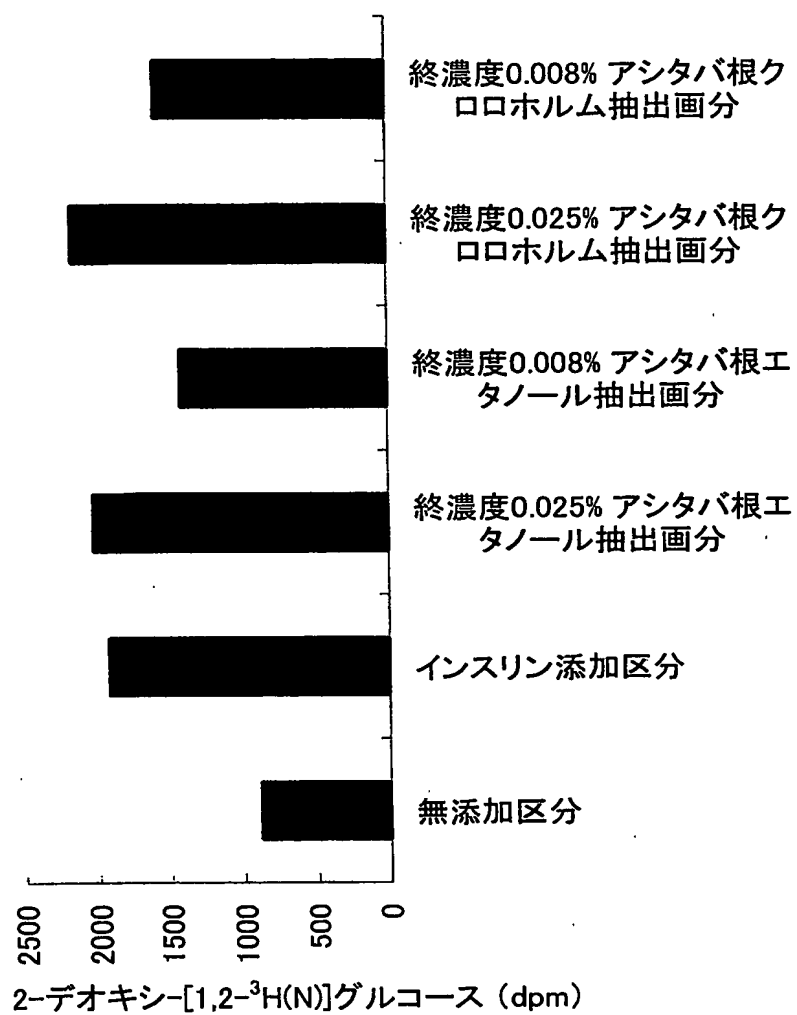


図3

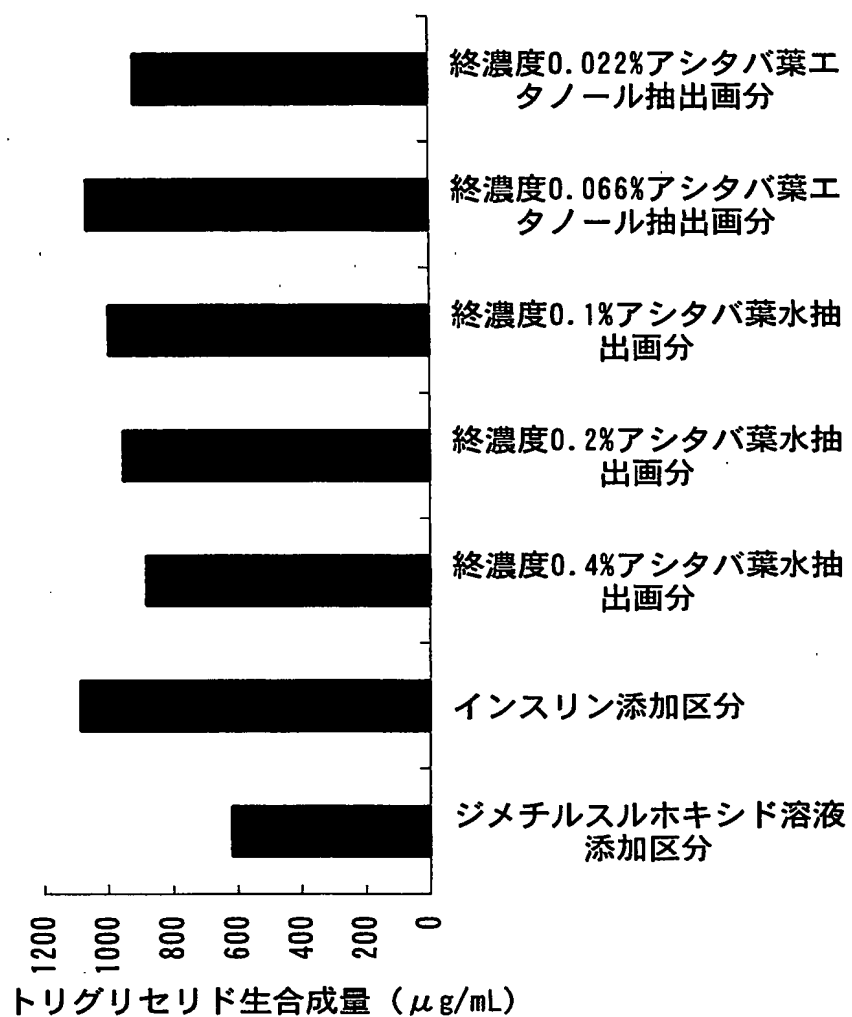
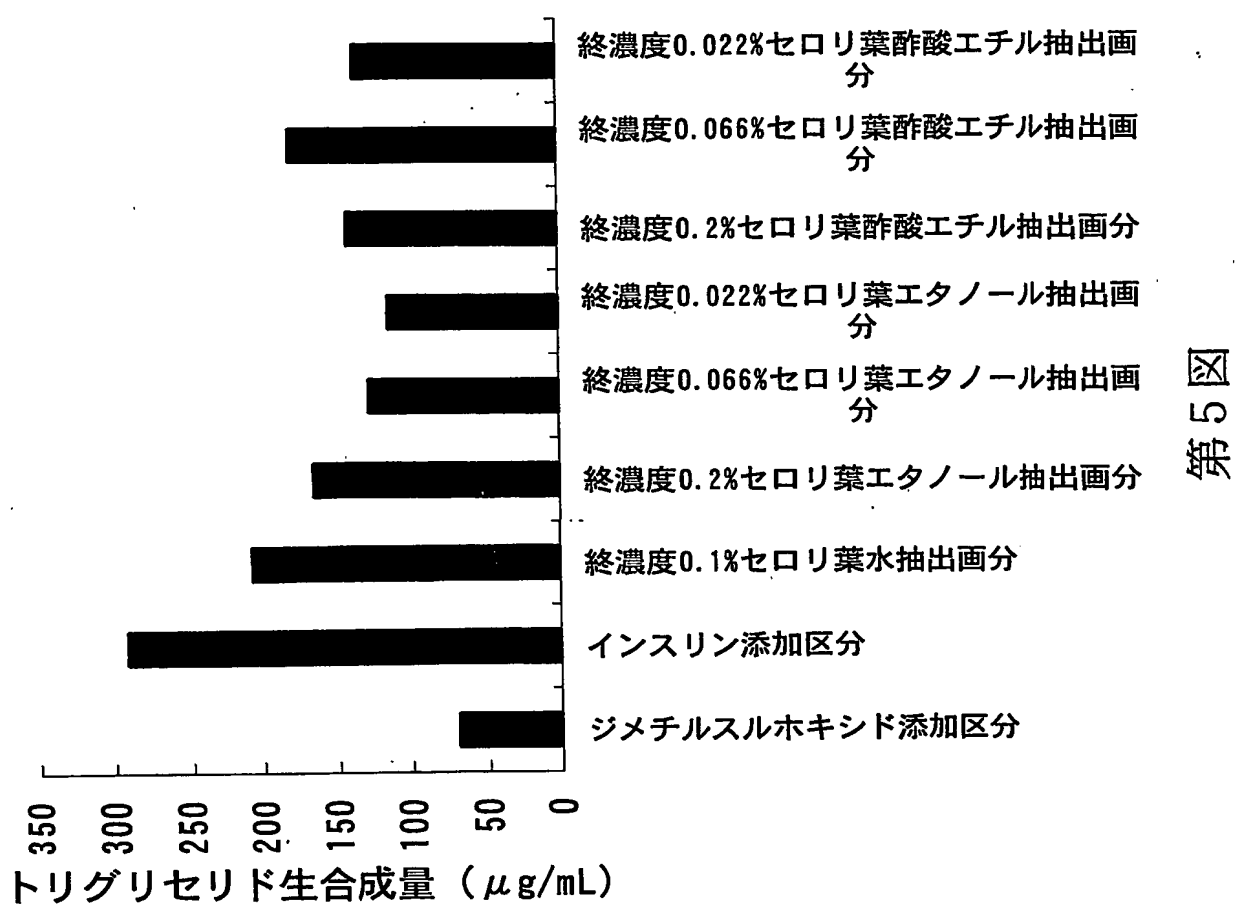


図4



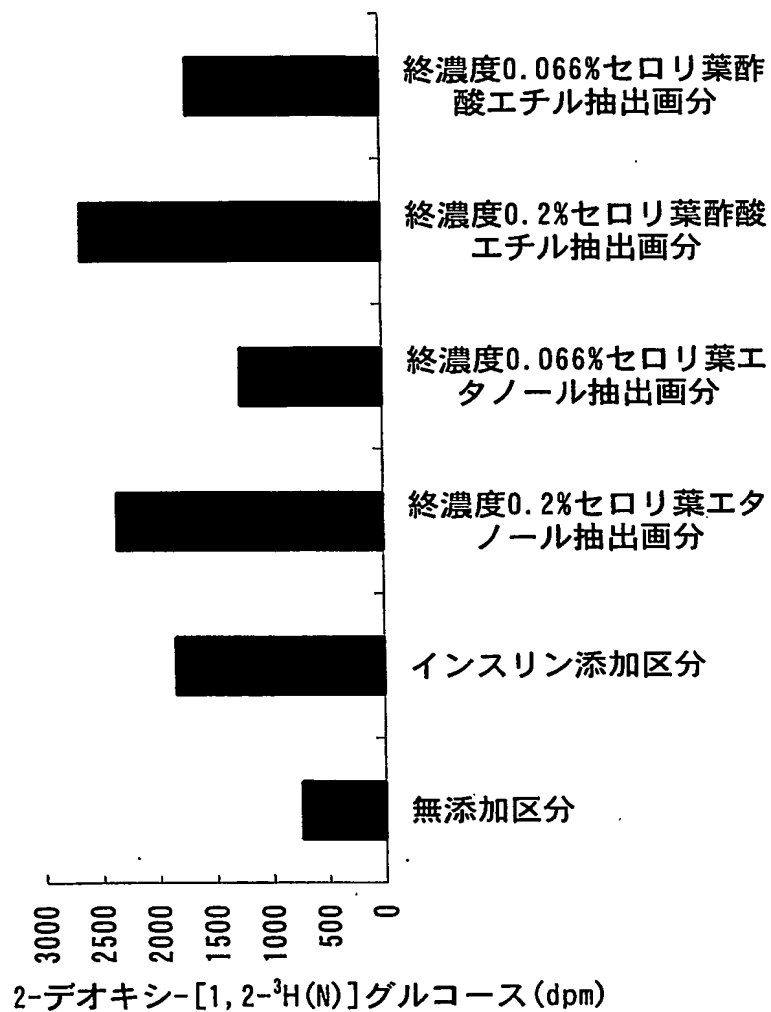


図 6 第

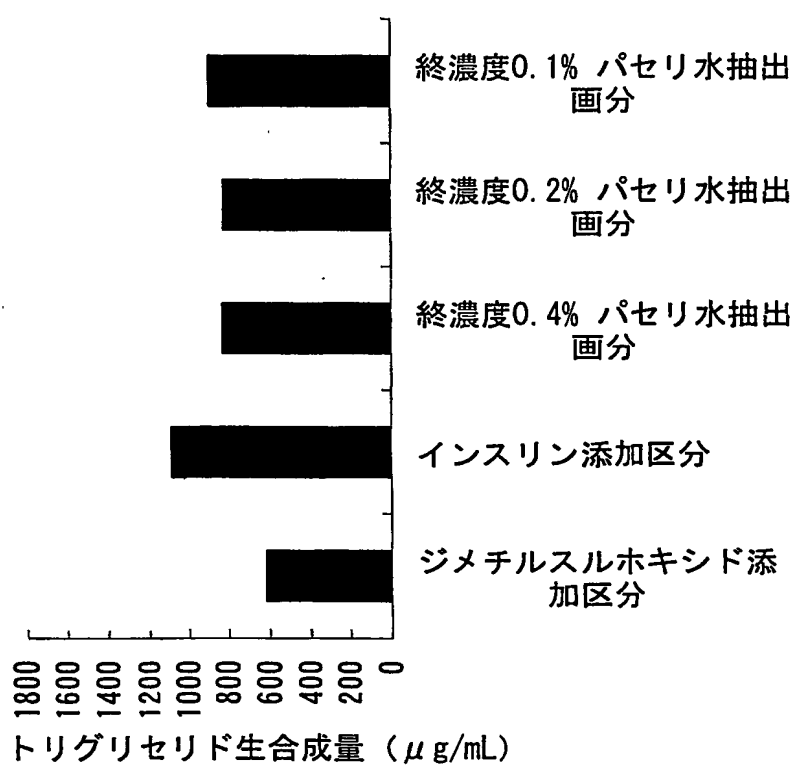
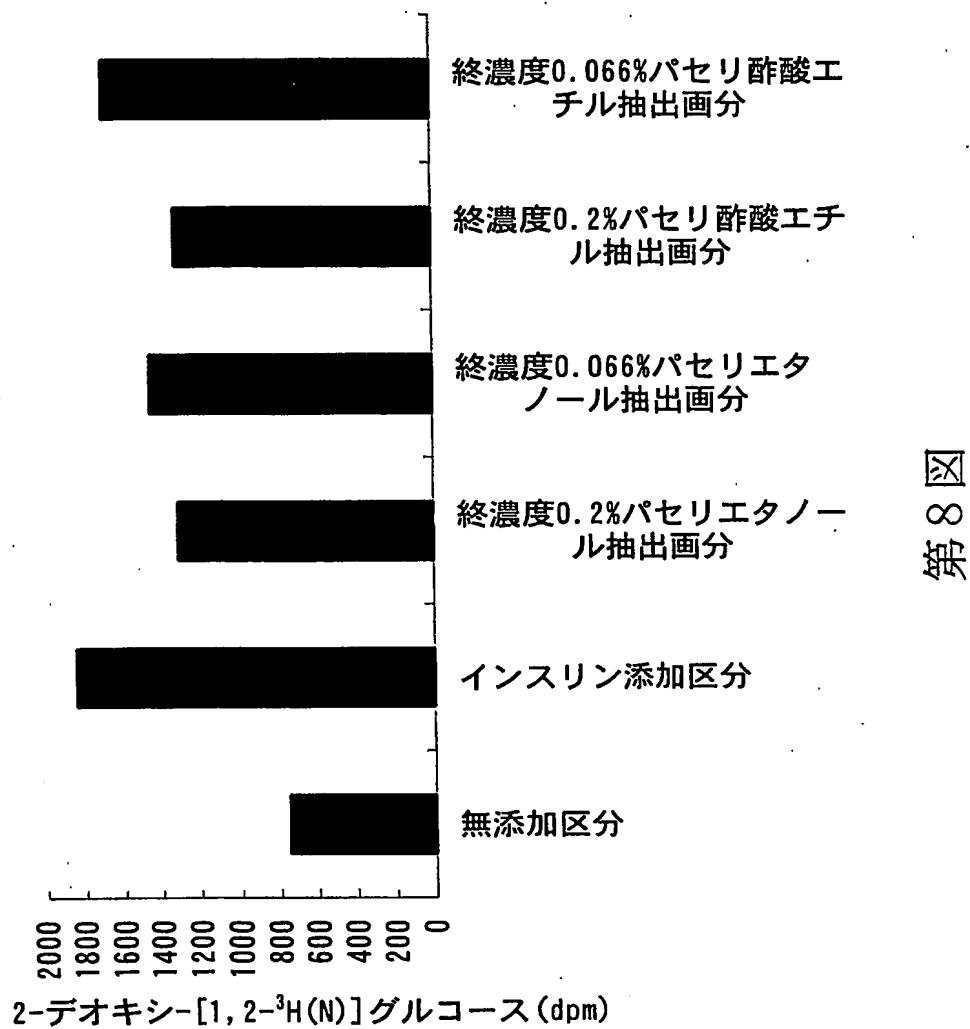


図7





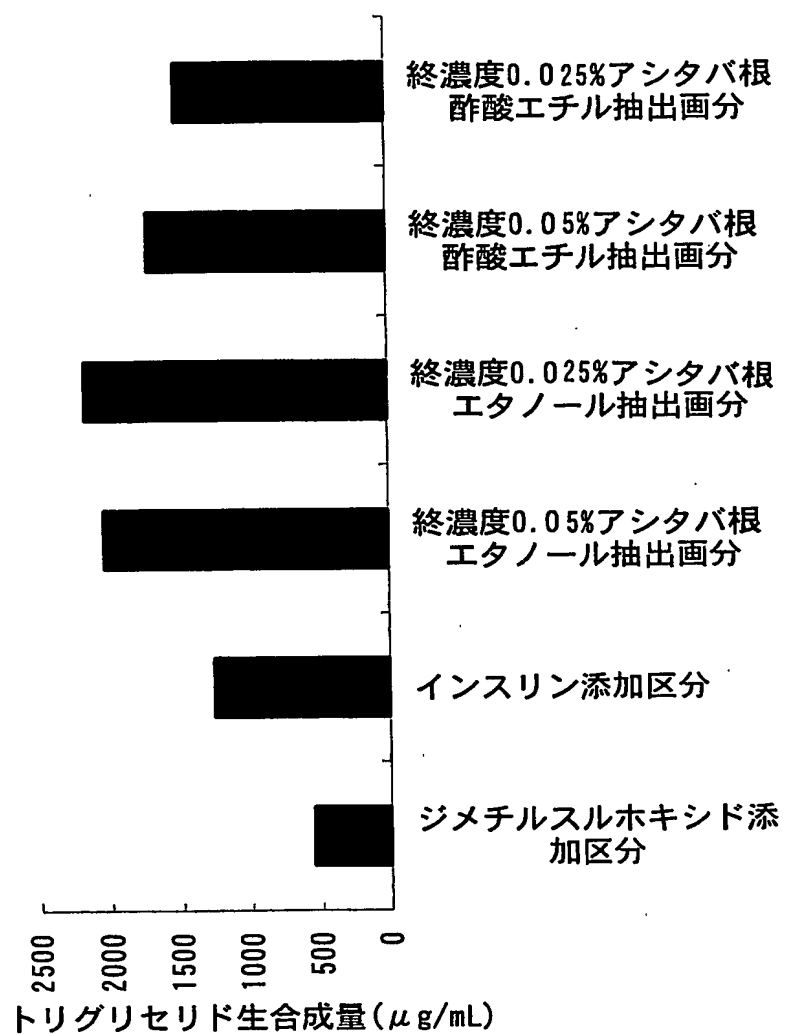


図9第

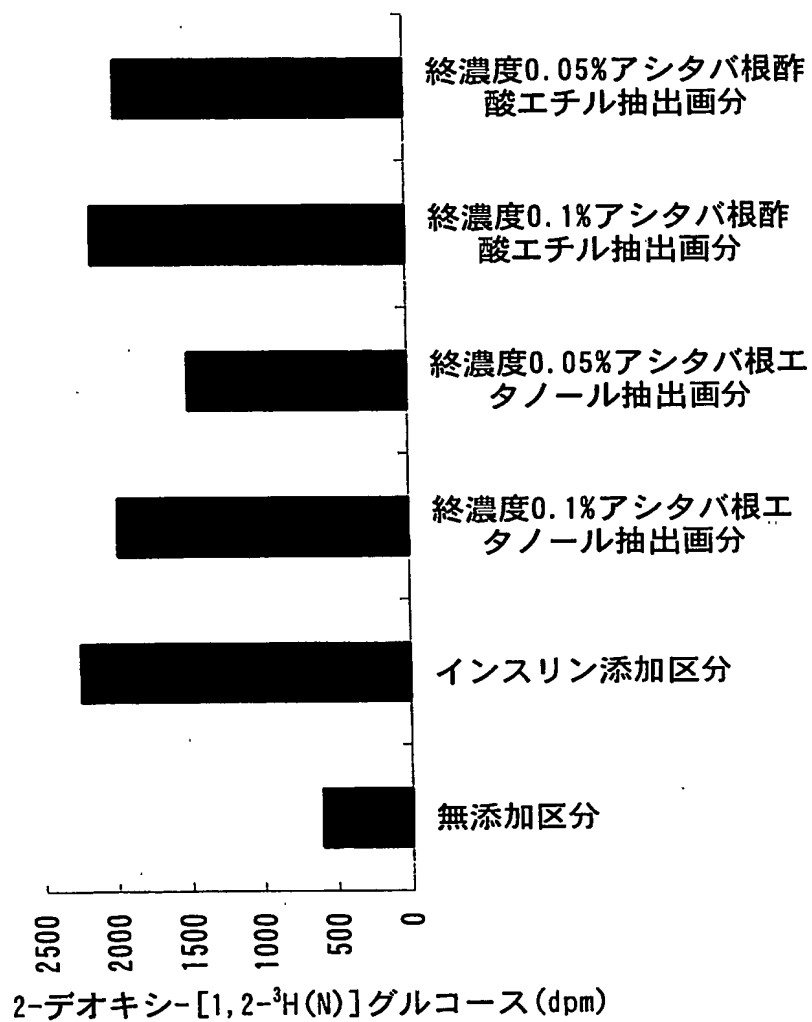
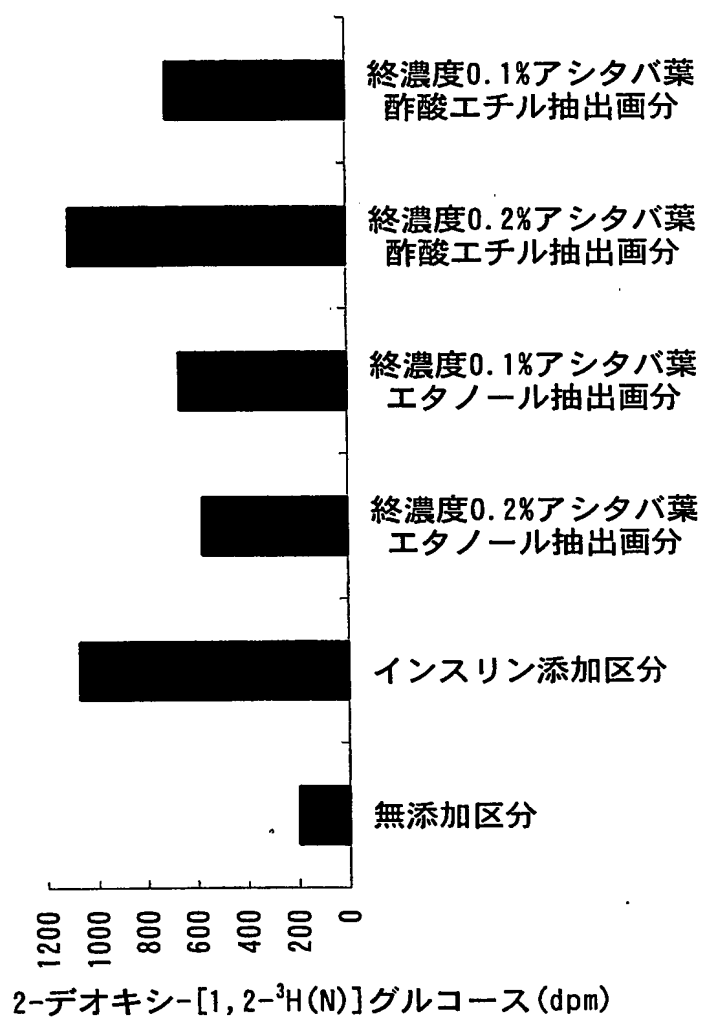


図10



第11図

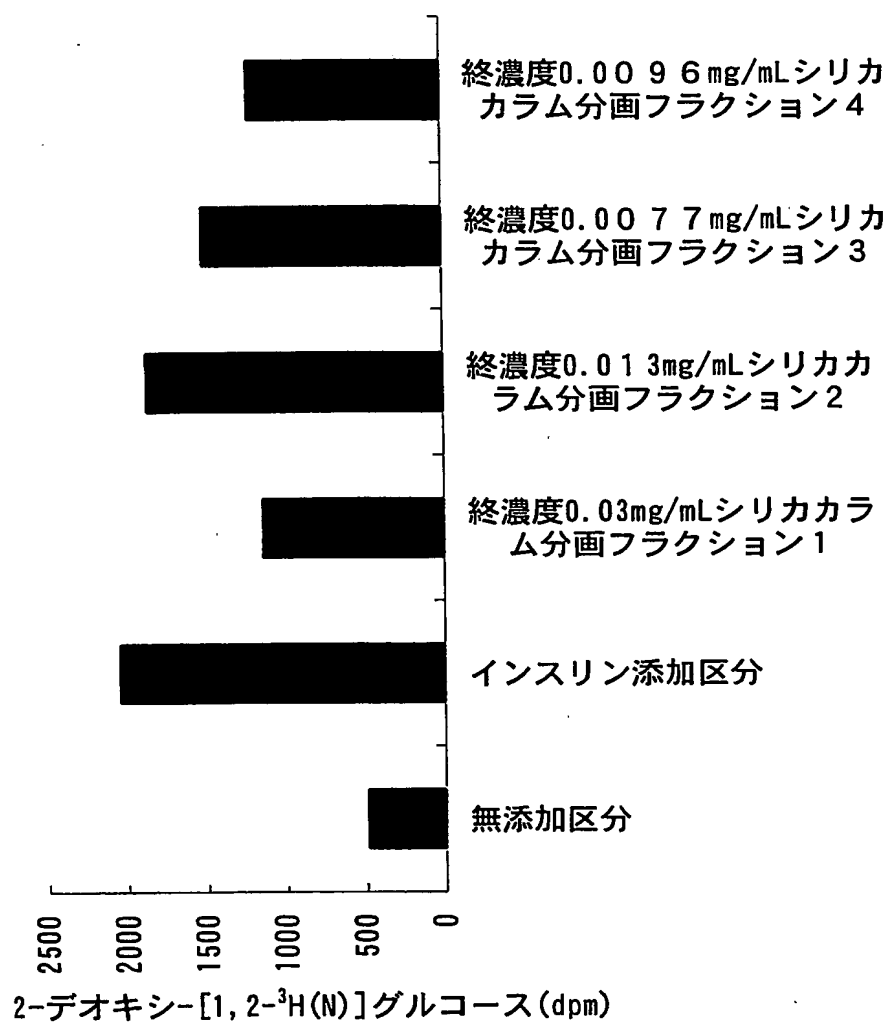
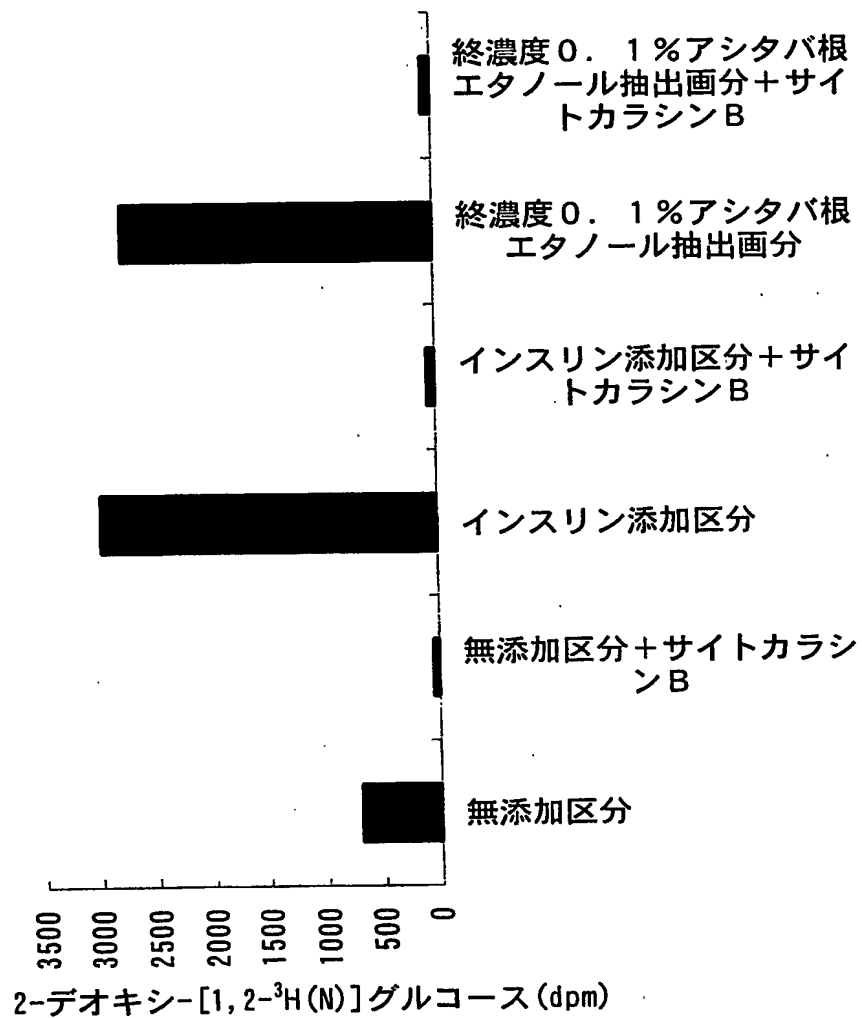
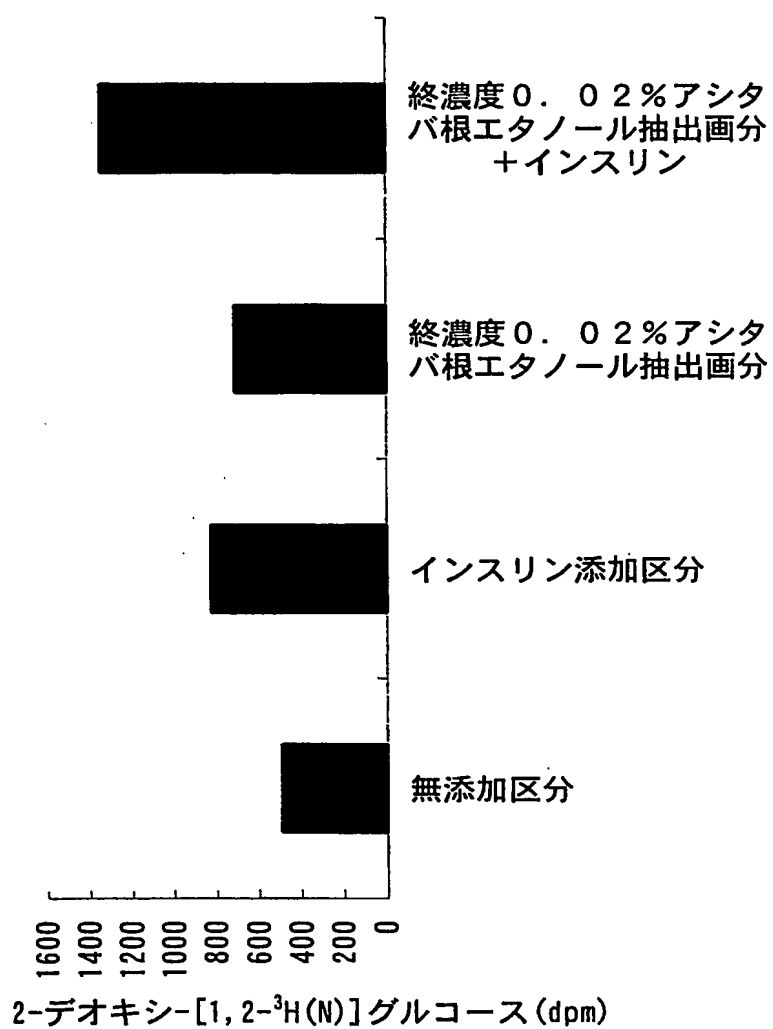


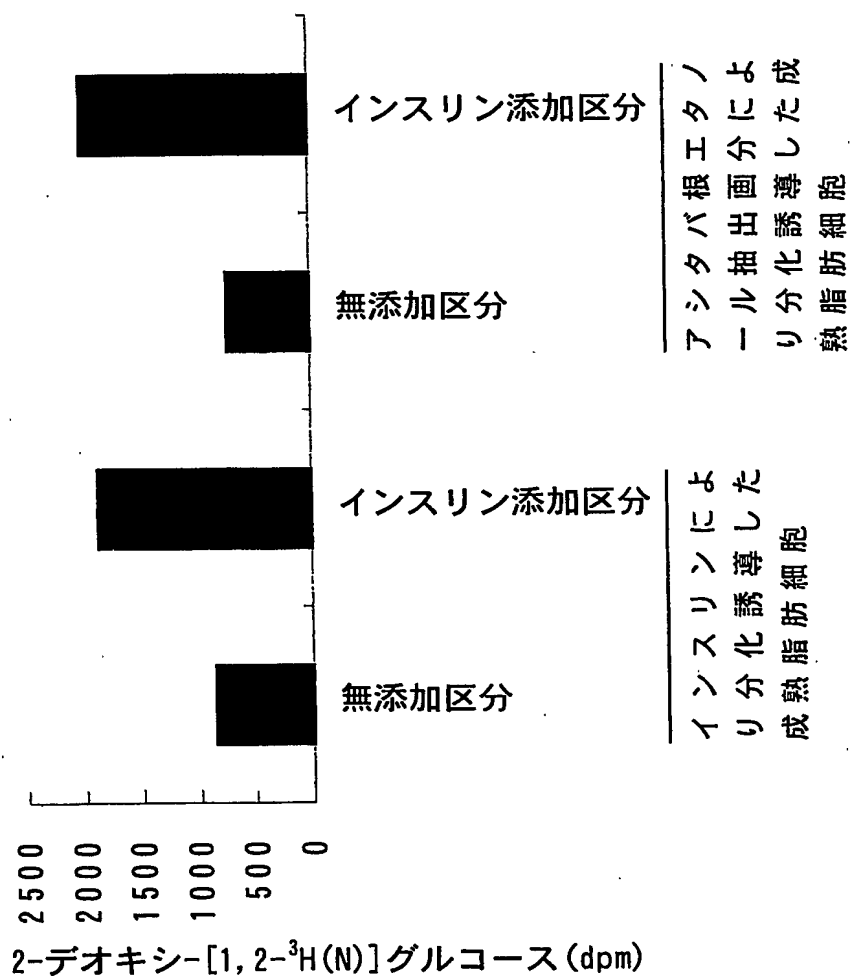
図12



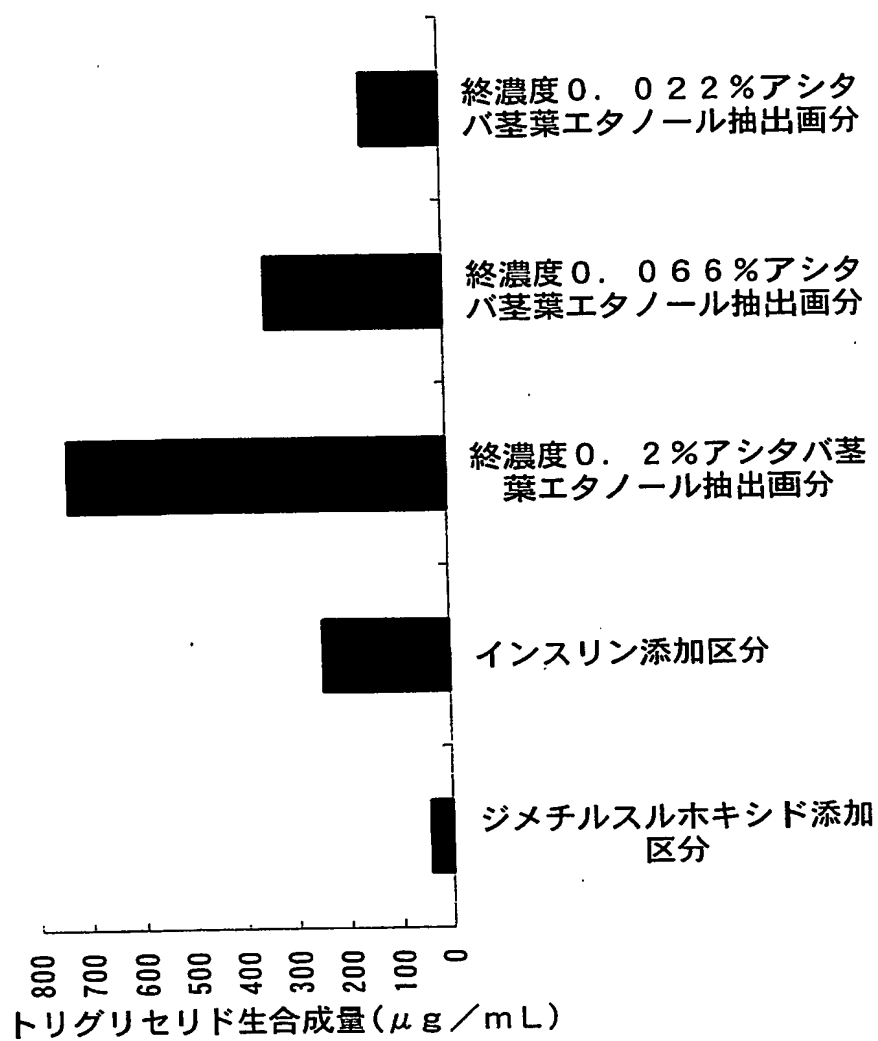
第 13 図



第 14 図



第15図



第16図



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/09978

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A61K35/78, A61P3/04, 3/10, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K35/78, A61P3/04, 3/10, 43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CA (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), EMBASE (STN), JICST (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Alison M. et al., Insulin-releasing and insulin-like activity of the traditional anti-diabetic plant Coriandrum sativum (coriander), British J. Nutrition, 1999, Vol.81, No.3, pages 203 to 209	1, 3, 5, 7, 9
X	JP 2002-80362 A (Kao Corp.), 19 March, 2002 (19.03.02), Par. Nos. [0001], [0012] (Family: none)	1-10
X	JP 2002-138045 A (Ichimaru Pharcos Co., Ltd.), 14 May, 2002 (14.05.02), (Family: none)	1, 3, 5, 9

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier document but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
18 September, 2003 (18.09.03)

Date of mailing of the international search report  
30 September, 2003 (30.09.03)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/09978

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 10-295325 A (Katsuharu NAGAMITSU), 10 November, 1998 (10.11.98), Claim 4 (Family: none)	1-6
X	JP 9-121810 A (Yugen Kaisha Hida Aroe), 13 May, 1997 (13.05.97), (Family: none)	1-6
Y	Keizo SEKIYA, "Carrot ni Hukumareru Zenku Sibo Saibo no Bunka Chosetsu Seibun", Shokuhin Kenkyu Seika Joho, 1997, Vol.9, No.1, pages 24 to 25	1-6, 9, 10
Y	JP 7-322847 A (Fujimaru Shokuhin Kabushiki Kaisha), 12 December, 1995 (12.12.95), Table 1 (Family: none)	1-6, 9, 10
A	C. Leigh Broadhurst et al., Insulin-like Biological Activity of Culinary and Medicinal Plant Aqueous Extracts in Vitro, J.Agric.Food.Chem, 2000, Vol.48, No.3, pages 849 to 852, table 1	1-10

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K35/78, A61P3/04, 3/10, 43/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K35/78, A61P3/04, 3/10, 43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), EMBASE (STN)  
JICST (JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Alison M. et al, Insulin-releasing and insulin-like activity of the traditional anti-diabetic plant Coriandrum sativum (coriander), British J. Nutrition, 1999, Vol. 81, No. 3, pp. 203-209	1, 3, 5, 7, 9
X	JP 2002-80362 A (花王株式会社) 2002. 03. 19, 【0001】, 【0012】 (ファミリーなし)	1-10
X	JP 2002-138045 A (一丸ファルコス株式会社) 2002. 05. 14 (ファミリーなし)	1, 3, 5, 9

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に関する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

18. 09. 03

国際調査報告の発送日

30.09.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鶴見 秀紀

4C

8415

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

## C (続き) 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 10-295325 A(長光勝治)1998. 11. 10, 請求項4(ファミリーなし)	1-6
X	JP 9-121810 A(有限会社肥田アロエ)1997. 05. 13(ファミリーなし)	1-6
Y	関谷 敬三, ニンジンに含まれる前駆脂肪細胞の分化調節成分, 食品研究成果情報, 1997, Vol. 9, No. 1, pp. 24-25	1-6, 9, 10
Y	JP 7-322847 A(ふじまる食品株式会社)1995. 12. 12, 表 1 (ファミリーなし)	1-6, 9, 10
A	C. Leigh Broadhurst et al, Insulin-like Biological Activity of Culinary and Medicinal Plant Aqueous Extracts in Vitro, J. Agric. Food. Chem, 2000, Vo. 48, No. 3, pp. 849-852, Table 1	1-10